

DENISE ZELAK LEITE BASTOS

**BIOTRANSFORMAÇÃO POR FUNGOS DO ÁCIDO BETULÍNICO E DERIVADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Química, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Química Orgânica.

Orientador: Brás Heleno de Oliveira

CURITIBA

2005

Aos meus filhos, Fernando e Henrique  
Ao meu marido, Roberto  
Aos meus pais, Eduardo e Danúsia.

Deus quer,  
O homem sonha,  
A obra nasce.

Fernando Pessoa

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por permitir que eu chegasse até aqui.

Ao Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira, pelos ensinamentos e eficiente orientação em todas as etapas deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Química.

As Prof<sup>as</sup>. Dr<sup>as</sup>. Ida Chapaval Pimentel, Ana Luiza L. Lordello, Beatriz Helena L. N. S. Maia, Maria Rita Sierakowski pelas discussões e sugestões a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Olavo Guimarães e a Simone Pereira pela identificação botânica da planta.

Ao Prof. Dr. José Dias de Souza Filho do Departamento de Química da UFMG, pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Aos colegas do laboratório de produtos naturais.

Aos funcionários do Departamento de Química por sua colaboração, em especial a Marcelino Câmara.

A CAPES que proporcionou o suporte financeiro para o desenvolvimento do trabalho.

A meus familiares pelo apoio e incentivo.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	IV
ÍNDICE .....	V
LISTA DE TABELAS .....	VII
LISTA DE ESQUEMAS .....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMO.....	XV
ABSTRACT .....	XVI
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 ASPECTOS GERAIS DO PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO .....	1
1.2 APLICAÇÕES DA BIOTRANSFORMAÇÃO .....	4
1.3 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS.....	9
1.4 ÁCIDO BETULÍNICO E DERIVADOS.....	11
2 OBJETIVOS .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 ESPECIFICAÇÕES GERAIS DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	17
3.2 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.....	18
3.3 OBTENÇÃO DOS SUBSTRATOS.....	18
3.3.1 <i>Ácido Betulínico</i> .....	18
3.3.2 <i>Ácido Betulônico</i> .....	19
3.3.3 <i>Betulina</i> .....	19
3.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS EPIFÍTICOS E ENDOFÍTICOS.....	20

3.5	BIOTRANSFORMAÇÃO EM ESCALA ANALÍTICA – SCREENING .....	21
3.5.1	<i>Repicagem das cepas</i> .....	21
3.5.2	<i>Fungos utilizados</i> .....	21
3.5.3	<i>Experimentos em escala analítica</i> .....	21
3.5.4	<i>Análise em CLAE</i> .....	22
3.6	BIOTRANSFORMAÇÃO EM ESCALA PREPARATIVA.....	22
3.6.1	<i>Experimentos em escala preparativa</i> .....	22
3.6.2	<i>Isolamento e identificação dos metabólitos</i> .....	23
3.7	ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>P. ORIENTALIS</i> .....	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1	ISOLAMENTO DOS FUNGOS EPIFÍTICOS E ENDOFÍTICOS .....	32
4.2	BIOTRANSFORMAÇÃO EM ESCALA ANALÍTICA – SCREENING .....	35
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS.....	36
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS ISOLADOS.....	39
4.4.1	<i>Caracterização dos metabólitos obtidos da biotransformação do ácido betulínico</i> .....	39
4.4.2	<i>Caracterização dos metabólitos obtidos da biotransformação do ácido betulônico</i> .....	44
4.4.3	<i>Caracterização do metabólito obtido da biotransformação da betulina</i> ...	57
4.4.4	<i>Mecanismo de reação de oxidação por via enzimática</i> .....	58
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS DO ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>P. ORIENTALIS</i> L. ....	61
5	CONCLUSÃO.....	64
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65
7	ANEXO.....	71

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS.....	2
TABELA 2: FUNGOS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO EM ESCALA ANALÍTICA..	21
TABELA 3: FREQUÊNCIA ABSOLUTA (F) E RELATIVA (FR %) DE FUNGOS EPIFÍTICOS ISOLADOS DA CASCA DE <i>P. ORIENTALIS</i> NOS MEIOS DE CULTURA BDA E SDA.....	32
TABELA 4: FREQUÊNCIA ABSOLUTA (F) E RELATIVA (FR %) DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA CASCA DE <i>P. ORIENTALIS</i> NOS MEIOS DE CULTURA BDA E SDA.....	33
TABELA 5: ANÁLISE DO SCREENING DO ÁCIDO BETULÍNICO (I), ÁCIDO BETULÔNICO (II) E BETULINA (III). ....	35
TABELA 6: COMPARAÇÃO DOS VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICO DE RMN $^{13}\text{C}$ DO ÁCIDO BETULÍNICO E BETULÔNICO ( $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz).....	38
TABELA 7: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS COMPARATIVOS DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS SUBSTÂNCIAS <b>4</b> E <b>12</b> E DO ÁCIDO BETULÔNICO ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	40
TABELA 8: ATRIBUIÇÕES DOS SINAIS POR RMN DE $^{13}\text{C}$ DA SUBSTÂNCIA <b>9</b> .....	42
TABELA 9: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE $^1\text{H}$ E DE $^{13}\text{C}$ DA SUBSTÂNCIA <b>9</b> - ÁCIDO 3 OXO, 15A-HIDROXILUP-20(29)-EN-28-ÓICO ( $\text{CDCl}_3$ , 400 E 100MHz).....	43
TABELA 10: ATRIBUIÇÕES DOS SINAIS DE ÁTOMOS DE CARBONO DA SUBSTÂNCIA - <b>1</b> .....	45
TABELA 11: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA SUBSTÂNCIA <b>1</b> - ÁCIDO 3-OXO, 7 $\beta$ -HIDROXI –LUP-20(29)-EN-28-ÓICO ( $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz) .....	46
TABELA 12: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ DAS SUBSTÂNCIAS <b>3</b> E <b>11</b> - ÁCIDO 3-OXO, 7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -DIIDROXI –LUP-20(29)-EN-28-ÓICO ( $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz). ....	48
TABELA 13: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA SUBSTÂNCIA <b>2</b> - ÁCIDO 3-OXO, 7 $\beta$ , 30 DIIDROXI–LUP-20(29)-EN-28-ÓICO ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz).....	50

TABELA 14: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE $^{13}\text{C}$ E $^1\text{H}$ DA SUBSTÂNCIA <b>6</b> - ÁCIDO 3-OXO, 12 $\beta$ HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 E 400MHz).....	52
TABELA 15: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA SUBSTÂNCIA <b>7</b> - ÁCIDO 3-OXO, 25 HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO ( $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz) .....	54
TABELA 16: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS COMPARATIVOS DE RMN DE $^1\text{H}$ E DE $^{13}\text{C}$ DAS SUBSTÂNCIAS <b>9</b> E <b>10</b> - ÁCIDO 3 OXO, 15A-HIDROXILUP-20(29)-EN-28-ÓICO ( $\text{CDCl}_3$ , 100 E 400MHz). .....	56
TABELA 17: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS COMPARATIVOS DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA BETULINA E DA SUBSTÂNCIA <b>8</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50MHz).....	58
TABELA 18: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS COMPARATIVOS DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DO $\beta$ -SITOSTEROL ( $\text{CDCl}_3$ , 50MHz) .....	62
TABELA 19: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE $^1\text{H}$ E DE $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 100 E 400 MHz) .....	63
TABELA 20 : VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICO (PPM) DE RMN $^{13}\text{C}$ DOS DERIVADOS OBTIDOS POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO BETULÍNICO...	72
TABELA 21 : VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICO (PPM) DE RMN $^{13}\text{C}$ DOS DERIVADOS OBTIDOS POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO BETULÔNICO	73
TABELA 22: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN $^{13}\text{C}$ DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>PLATANUS ORIENTALIS</i> L.....	74



## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1: REPRESENTAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO .....	1
ESQUEMA 2: BIOTRANSFORMAÇÃO DA TESTOSTERONA. ....	5
ESQUEMA 3: BIOTRANSFORMAÇÃO DA DEOXYCORTICOSTERONA.....	5
ESQUEMA 4: BIOTRANSFORMAÇÃO DA 11 $\alpha$ -HIDROXIPROGESTERONA.....	6
ESQUEMA 5: METABOLISMO DOS FÁRMACOS EM MAMÍFEROS .....	7
ESQUEMA 6: BIOTRANSFORMAÇÃO DO ANTICONVULSIVO 5-H-DIBENZO(A,D) CICLOEPTANO-5-CARBOXAMIDA.....	8
ESQUEMA 7: METABÓLITOS GERADOS NA BIOTRANSFORMAÇÃO PELO <i>ARTRHOBOTRYS</i> SP. FRENTE AOS SUBSTRATOS .....	24
ESQUEMA 8: METABÓLITOS GERADOS NA BIOTRANSFORMAÇÃO PELO <i>CHAETOPHOMA</i> SP. FRENTE AOS SUBSTRATOS.....	26
ESQUEMA 9: METABÓLITOS GERADOS NA BIOTRANSFORMAÇÃO PELO <i>COLLETOTRICHUM</i> SP. FRENTE AOS SUBSTRATOS. ....	28
ESQUEMA 10: METABÓLITOS GERADOS NA BIOTRANSFORMAÇÃO PELO <i>DEMATIUM</i> SP. FRENTE AO SUBSTRATO. ....	29
ESQUEMA 11: FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA CASCA DO CAULE DE <i>P. ORIENTALIS</i> L. ....	31
ESQUEMA 12 : MECANISMO GERAL DAS MONOXIGENASES .....	59
ESQUEMA 13: MECANISMO DE MONOXIGENAÇÃO CATALISADA POR CITOCROMO P-450.....	60

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTRUTURA DO ÁCIDO BETULÍNICO E SEUS DERIVADOS .....	11
FIGURA 2: DERIVADOS DO ÁCIDO BETULÍNICO OBTIDOS VIA QUÍMICA. ....	13
FIGURA 3: ESTRUTURA DOS DERIVADOS DO ÁCIDO BETULÍNICO POR BIOTRANSFORMAÇÃO. ....	14
FIGURA 4: ESTRUTURA DOS DERIVADOS DA BETULINA E DO ÁCIDO BETULÔNICO POR BIOTRANSFORMAÇÃO .....	15
FIGURA 5: ESTRUTURA DO ÁCIDO BETULÍNICO E DO ÁCIDO BETULÔNICO ...	36
FIGURA 6: ESTRUTURA DAS SUBSTÂNCIAS <b>4</b> E <b>12</b> . ....	39
FIGURA 7: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA <b>9</b> .....	41
FIGURA 8: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA <b>1</b> .....	44
FIGURA 9: ESTRUTURA DAS SUBSTÂNCIAS <b>3</b> E <b>11</b> . ....	46
FIGURA 10: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA <b>2</b> .....	48
FIGURA 11: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA <b>6</b> .....	50
FIGURA 12: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA <b>7</b> . ....	52
FIGURA 13: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA <b>10</b> .....	54
FIGURA 14: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA <b>8</b> . ....	57
FIGURA 15: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA <b>EP-1</b> .....	61
FIGURA 16: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA <b>EP-2</b> .....	62
FIGURA 17: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO – ÁCIDO BETULÍNICO (I) .....	75
FIGURA 18: ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ – ÁCIDO BETULÍNICO (I) - $\text{CDCl}_3$ ; 200MHz .	75
FIGURA 19: ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ – ÁCIDO BETULÍNICO (I) - $\text{CDCl}_3$ ; 50MHz ...	76
FIGURA 20: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO – ÁCIDO BETULÔNICO (II) .....	76
FIGURA 21 : ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ – ÁCIDO BETULÔNICO (II) - $\text{CDCl}_3$ ; 400MHz	77
FIGURA 22: ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ – ÁCIDO BETULÔNICO (II)- $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz	77
FIGURA 23: ESPECTRO DE DEPT – ÁCIDO BETULÔNICO (II) - $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz .....	78
FIGURA 24: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA <b>1</b> – ÁCIDO 3-OXO, 7B-HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO .....	78
FIGURA 25: ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA SUBSTÂNCIA <b>1</b> – ÁCIDO 3-OXO, 7B- HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - $\text{CDCl}_3$ ; 400MHz .....	79
FIGURA 26: ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA SUBSTÂNCIA <b>1</b> – ÁCIDO 3-OXO, 7B- HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO- $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz .....	79

FIGURA 27: ESPECTRO DEPT DA SUBSTÂNCIA 1 – ÁCIDO 3-OXO, 7B-HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO- CDCL <sub>3</sub> ;100MHZ.....	80
FIGURA 28: MAPA DE CONTORNO COSY DE <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA 1 – ÁCIDO 3-OXO, 7B-HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - CDCL <sub>3</sub> ; 400MHZ .....	80
FIGURA 29: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA 2 - ÁCIDO 3-OXO, 7B, 30-DIIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO .....	81
FIGURA 30: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA 2 – ÁCIDO 3-OXO, 7B,30-DIIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - CDCL <sub>3</sub> ; 400 MHz .....	81
FIGURA 31: ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA 2 – ÁCIDO 3-OXO,7B,30-DIIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - CDCL <sub>3</sub> ; 100MHZ .....	82
FIGURA 32: ESPECTRO DEPT DA SUBSTÂNCIA 2 – ÁCIDO 3-OXO, 7B,30 -DIIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - CDCL <sub>3</sub> ; 100MHZ .....	82
FIGURA 33: MAPA DE CONTORNO COSY DE <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA 2 – ÁCIDO 3-OXO, 7B,30-DIIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - CDCL <sub>3</sub> ; 400 MHz.....	83
FIGURA 34: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DAS SUBSTÂNCIAS 3 E 11 - ÁCIDO 3-OXO, 7B,15A-DIIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO .....	83
FIGURA 35: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DAS SUBSTÂNCIAS 3 E 11 - ÁCIDO 3-OXO, 7B,15A-DIIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - CDCL <sub>3</sub> ; 400MHZ .....	84
FIGURA 36: ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS SUBSTÂNCIAS 3 E 11 – ÁCIDO 3-OXO, 7B,15A-DIIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - CDCL <sub>3</sub> ; 100MHZ.....	84
FIGURA 37: ESPECTRO DEPT DAS SUBSTÂNCIAS 3 E 11– ÁCIDO 3-OXO, 7B,15A-DIIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - CDCL <sub>3</sub> ; 100MHZ .....	85
FIGURA 38: MAPA DE CONTORNO COSY DE <sup>1</sup> H DAS SUBSTÂNCIAS 3 E 11 – ÁCIDO 3-OXO, 7B,15A-DIIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - CDCL <sub>3</sub> ; 400MHZ .....	85
FIGURA 39: MAPA DE CONTORNO HMQC DAS SUBSTÂNCIAS 3 E 11 – ÁCIDO 3-OXO, 7B,15A-DIIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - CDCL <sub>3</sub> ; 400MHZ .....	86
FIGURA 40: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DAS SUBSTÂNCIAS 4 E 12 – ÁCIDO BETULÔNICO - CDCL <sub>3</sub> ; 200MHZ .....	86
FIGURA 41: ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS SUBSTÂNCIAS 4 E 12 – ÁCIDO BETULÔNICO - CDCL <sub>3</sub> ; 50MHZ .....	87
FIGURA 42: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA 6 – ÁCIDO 3-OXO,12B HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO – CDCL <sub>3</sub> ; 400MHZ .....	87

FIGURA 43: ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA SUBSTÂNCIA 6 – ÁCIDO 3-OXO, 12 B HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO – $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz .....	88
FIGURA 44: ESPECTRO DE DEPT DA SUBSTÂNCIA 6 – ÁCIDO 3-OXO, 12B HIDROXI- LUP-20(29)-EN-28-ÓICO – $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz .....	88
FIGURA 45: MAPA DE CONTORNO HMQC DA SUBSTÂNCIA 6 – ÁCIDO 3-OXO, 12B HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO – $\text{CDCl}_3$ ; 400MHz .....	89
FIGURA 46: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA 7 - ÁCIDO 3-OXO, 25 HIDROXI-LUP-20(29)EN-28-ÓICO .....	89
FIGURA 47: ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA SUBSTÂNCIA 7 - ÁCIDO 3-OXO, 25 HIDROXI-LUP-20(29)EN-28-ÓICO – $\text{CDCl}_3$ , GTS. PYD; 400MHz .....	90
FIGURA 48: ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA SUBSTÂNCIA 7 - ÁCIDO 3-OXO, 25 HIDROXI-LUP-20(29)EN-28-ÓICO – $\text{CDCl}_3$ , GTS. PYD; 100MHz.....	90
FIGURA 49: ESPECTRO DE DEPT DA SUBSTÂNCIA 7 - ÁCIDO 3-OXO, 25 HIDROXI- LUP-20(29)EN-28-ÓICO – $\text{CDCl}_3$ , GTS. PYD; 100MHz.....	91
FIGURA 50: MAPA DE CONTORNO COSY DE $^1\text{H}$ DA SUBSTÂNCIA 7 - ÁCIDO 3-OXO, 25 HIDROXI-LUP-20(29)EN-28-ÓICO – $\text{CDCl}_3$ , GTS.PYD.; 400MHz .....	91
FIGURA 51: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS SUSBTÂNCIAS 9 E 10 - ÁCIDO 3-OXO, 15A -HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO .....	92
FIGURA 52 : ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DAS SUBSTÂNCIAS 9 E 10 – ÁCIDO 3-OXO, 15A -HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - $\text{CDCl}_3$ ; 400MHz .....	92
FIGURA 53: ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS SUBSTÂNCIAS 9 E 10 – ÁCIDO 3-OXO, 15A -HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz .....	93
FIGURA 54: ESPECTRO DE DEPT DAS SUBSTÂNCIAS 9 E 10 – ÁCIDO 3-OXO, 15A - HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz .....	93
FIGURA 55: MAPA DE CONTORNO HMQC DAS SUBSTÂNCIAS 9 E 10 – ÁCIDO 3-OXO, 15A-HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - $\text{CDCl}_3$ ; 400MHz.....	94
FIGURA 56: MAPA DE CONTORNO COSY DE $^1\text{H}$ DAS SUSBTÂNCIAS 9 E 10 – ÁCIDO 3-OXO, 15A-HIDROXI-LUP-20(29)-EN-28-ÓICO - $\text{CDCl}_3$ ; 400MHz .....	94
FIGURA 57: ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA SUSBTÂNCIA 8 – 3-OXOLUP-20(29)-EN- 28-OL – $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz .....	95
FIGURA 58: ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA SUSBTÂNCIA 8 – 3-OXOLUP-20(29)-EN- 28-OL – $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz .....	95

FIGURA 59: ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA SUSBTÂNCIA EP-1 – $\beta$ -SISTOSTEROL - $\text{CDCl}_3$ ; 200MHz.....	96
FIGURA 60: ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA SUBSTÂNCIA EP-1 – $\beta$ -SISTOSTEROL - $\text{CDCl}_3$ ; 50MHz.....	96
FIGURA 61: ESPECTRO DE DEPT DA SUBSTÂNCIA EP-1 – $\beta$ -SISTOSTEROL - $\text{CDCl}_3$ ; 50MHz.....	97
FIGURA 62: ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA SUBSTÂNCIA EP-2 – ÁCIDO DIIDROBETULÍNICO - $\text{CDCl}_3$ , GRS. PYD.; 400MHz .....	97
FIGURA 63: ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA SUBSTÂNCIA EP-2 – ÁCIDO DIIDROBETULÍNICO - $\text{CDCl}_3$ , GTS. PYD.; 100MHz .....	98
FIGURA 64: ESPECTRO DE DEPT DA SUBSTÂNCIA EP-2 – ÁCIDO DIIDROBETULÍNICO - $\text{CDCl}_3$ , GTS. PYD.; 100MHz .....	98
FIGURA 65: MAPA DE CONTORNO COSY $^1\text{H}$ DA SUBSTÂNCIA EP-2 – ÁCIDO DIIDROBETULÍNICO - $\text{CDCl}_3$ , GTS. PYD.; 400MHz.....	99
FIGURA 66: MAPA DE CONTORNO HMQC DA SUBSTÂNCIA EP-2 – ÁCIDO DIIDROBETULÍNICO - $\text{CDCl}_3$ , GTS. PYD.; 400MHz.....	99
FIGURA 67: ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA SUSBTÂNCIA EP-3 - $\text{CDCl}_3$ ; 200MHz .....	100
FIGURA 68: ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA SUSBTÂNCIA EP-3 - $\text{CDCl}_3$ ; 50MHz .....	100
FIGURA 69: ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA SUSBTÂNCIA 5 - $\text{CDCl}_3$ ; 200MH ...	101
FIGURA 70: ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA SUSBTÂNCIA 5 - $\text{CDCl}_3$ ; 50MHz....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS

BDA – meio de cultura batata-dextrose-ágar  
°C – graus centígrados  
CCD – cromatografia em camada delgada  
CCDC – cromatografia em camada delgada centrífuga  
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência  
CDCl<sub>3</sub> – clorofórmio deuterado  
cm – centímetro  
COSY – correlação homonuclear (H x H)  
DEPT – espectro de RMN <sup>13</sup>C utilizando transferência de polarização  
DMSO – dimetilsulfóxido  
d – duplete  
dd – duplo duplete  
dt – duplo tripleto  
EM – espectro de massas  
g – grama  
g/L – grama por litro  
HMQC – correlação heteronuclear (H x C)  
Hz – hertz  
IV – infravermelho  
J – constante de acoplamento  
MeOH - metanol  
m – multiplete  
mg – miligrama  
mL - mililitro  
mm – milímetro  
nm - nanômetro  
ppm – parte por milhão  
R<sub>f</sub> – razão de frente  
RMN <sup>13</sup>C – ressonância magnética nuclear de Carbono-13  
RMN <sup>1</sup>H – ressonância magnética nuclear de Hidrogênio  
rpm – rotações por minuto  
SDA – meio de cultura sabouraud-dextrose-ágar  
s – simpleto  
t – tripleto  
TMS – tetrametilsilano  
tr – tempo de retenção  
UV - ultravioleta  
λ<sub>máx</sub> – comprimento de onda (nm) de absorção máxima  
δ – deslocamento químico  
χ<sup>2</sup> – qui-quadrado  
μg/L – micrograma por litro  
μL - microlitro  
μm – micrometros

## RESUMO

Modificações nas estruturas de moléculas complexas podem ser realizadas através de sistemas envolvendo microrganismos. O ácido betulínico (I), o ácido betulônico (II) e a betulina (III), por possuírem essa característica e apresentarem importantes atividades farmacológicas, foram escolhidos para serem biotransformados por fungos.

Com a finalidade de se obter os substratos, fez-se o estudo fitoquímico da casca do caule de *Platanus orientalis* L., com o isolamento e a identificação de três substâncias: ácido betulínico (I); ácido diidrobetulinico (XIV) e  $\beta$ -sitosterol (XIII). O ácido diidrobetulinico é inédito como composto natural. O ácido betulônico foi obtido por derivatização do ácido betulínico.

Para obter os fungos necessários para a biotransformação, foram isolados e identificados os fungos epifíticos e endofíticos associados à casca de *P. orientalis*. Após realização de experimentos preliminares foram selecionados os fungos *Arthobotrys* sp., *Chaetophoma* sp., *Colletotrichum* sp. e *Dematium* sp.

A biotransformação do ácido betulínico pelo fungo *Chaetophoma* sp. e *Dematium* sp. resultou na sua oxidação levando ao ácido betulônico (II); pelo *Colletotrichum* sp. resultou no ácido 3-oxo,15 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-28-óico. O ácido betulônico (II) foi biotransformado pelos fungos: *Arthobotrys* sp. gerando os metabólitos ácido 3-oxo, 7 $\beta$ -hidroxilup-20(29)-en-28-óico, ácido 3-oxo, 7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diidroxilup-20(29)-en-28-óico e ácido 3-oxo, 7 $\beta$ ,30-diidroxilup-20(29)-en-28-óico; *Chaetophoma* sp. formando o ácido 3-oxo, 12 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-28-óico, ácido 3-oxo, 7 $\beta$ ,25-diidroxilup-20(29)-en-28-óico e *Colletotrichum* sp. produzindo o ácido 3-oxo, 15 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-28-óico e o ácido 3-oxo, 7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diidroxilup-20(29)-en-28-óico. A betulina (III) foi biotransformada pelo fungo *Chaetophoma* sp. que levou a formação da substância 3-oxo-lup-20(29)-en-28-ol.

Portanto, através da biotransformação dos substratos propostos, foram obtidos 6 metabólitos inéditos, além do ácido betulônico e do ácido 3-oxo,7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diidroxilup-20(29)-en-28-óico.

## ABSTRACT

Complex molecules can be modified through microbial transformation. The betulinic acid (I), betulonic acid (II) and betulin (III), for this characteristic and their important pharmacologic activities, have been chosen to be biotransformed by fungi.

In order to obtain the compounds, the phytochemical study of *Platanus orientalis* L. bark was done and allowed the isolation and identification of three components: betulinic acid (I); dihydrobetulinic acid (XIV) and  $\beta$ -sitosterol (XIII). The dihydrobetulinic acid is unknown as a natural compound.

To get the necessary fungi for the biotransformation, it was isolated and identified epiphytes and endophytes fungi associated with the *P.orientalis* bark. After accomplishment of screening the *Arthobotrys* sp., *Chaetophoma* sp., *Colletotrichum* sp. and *Dematium* fungi were selected.

The biotransformation of the betulinic acid by *Chaetophoma* sp. and *Dematium* sp. fungi through its oxidation resulted in betulonic acid (II) and for the *Colletotrichum* sp. resulted in 3-oxo-15 $\alpha$ -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid. The betulonic acid (II) was biotransformed by the fungi : *Arthobotrys* sp. resulted in metabolites which were identified as 3-oxo-7 $\beta$ -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid, 3-oxo-7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -dihydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid and 3-oxo-7 $\beta$ ,30-dihydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid; *Chaetophoma* sp. resulted in 3-oxo-12 $\alpha$ -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid and 3-oxo-7 $\beta$ ,25-dihydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid; and *Colletotrichum* sp. resulting in 3-oxo-15 $\alpha$ -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid and 3-oxo-7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -dihydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid. The betulin (III) was biotransformed by the fungi *Chaetophoma* sp. resulted in 3-oxo-lup-20(29)-en-28-ol.

Summarising, through the biotransformation of proposed compounds six unknown metabolites, beyond the betulonic acid and 3-oxo, 7 $\beta$ , 15 $\alpha$ -dihydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid were identified.



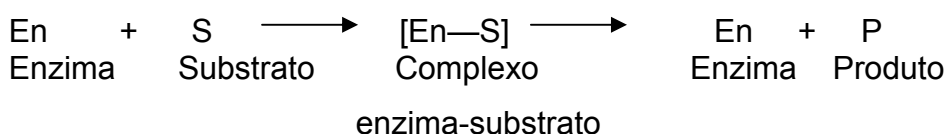
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS DO PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Biotransformações são reações de compostos orgânicos realizadas pelas enzimas que se encontram na forma isolada ou no interior dos microrganismos. A molécula de um determinado composto orgânico pode ser modificada através de transformação funcional, acompanhada ou não de degradação do esqueleto carbônico.

As enzimas, em sua maioria, são proteínas formadas a partir de 20 aminoácidos cuja sequência e arranjo tridimensional determinam a função bioquímica dessas biomoléculas. A ação enzimática de uma proteína está sempre associada a um sítio ativo, área na superfície da enzima na qual o substrato se encaixa através de forças intermoleculares, conferindo a essa proteína uma especificidade catalítica (COMASSETO, 2002).

O composto-alvo da enzima, denominado substrato, é convertido em um outro composto denominado produto. A enzima e o substrato combinam-se formando um “complexo enzima-substrato”, que se dissocia formando o produto, como se observa na representação esquemática abaixo:



### ESQUEMA 1: REPRESENTAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO

Podemos enumerar algumas vantagens do uso das enzimas na obtenção de derivados (FABER, 1997):

1. são catalisadores muito eficientes;
2. são ambientalmente aceitáveis (degradáveis);
3. trabalham em condições reacionais suaves;
4. possuem uma alta tolerância aos substratos;
5. podem catalisar diferentes reações químicas.

As enzimas são classificadas de acordo com as reações químicas que catalisam, como mostra tabela 1:

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS

Classes de enzima	Tipo de reação
1. Oxidoredutases	Reações de transferência de elétrons
2. Transferases	Transferência de grupos funcionais
3. Hidrolases	Reação de hidrólise
4. Liases	Adição de grupos a ligações duplas e vice-versa
5. Isomerases	Reações de isomerização
6. Ligases	Formação de ligação com clivagem de ATP

Alguns biocatalisadores podem realizar reações difíceis de se obter por métodos tradicionais em química orgânica, tornando-os recomendáveis na síntese de compostos enantiomericamente puros. Isto se deve, principalmente, a aspectos de seletividade das reações enzimáticas tais como: (LEADLAY, 1993; PATEL, 1997)

- Quimiosseletividade:

Algumas enzimas podem reagir com um único grupo funcional, mesmo na presença de outros grupos químicos reativos. Isto leva a produtos reacionais mais “limpos”, facilitando o processo de purificação.

- Regiosseletividade:

Devido à sua estrutura tridimensional complexa, as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais que estão situados em diferentes regiões da mesma molécula substrato.

- Enantiosseletividade:

Quase todas as enzimas são formadas de L-amino ácidos, portanto são catalisadores quirais. Como consequência, qualquer tipo de quiralidade presente na molécula do substrato é “reconhecida” na formação do complexo enzima-substrato. Assim, um substrato pró-quiral pode ser transformado em um produto opticamente ativo e ambos os enantiômeros de um substrato racêmico podem reagir a velocidades diferentes.

As biotransformações podem empregar enzimas isoladas ou microrganismos - células íntegras (bactéria, fungos e leveduras). A escolha da metodologia a ser utilizada leva em conta a estabilidade do substrato, o pH do meio e a viabilidade do

sistema enzimático microbiano. Todas as metodologias apresentam vantagens e desvantagens que devem ser analisadas. Salienta-se que os microrganismos são particularmente vantajosos, pois apresentam uma taxa de crescimento rápida e um sistema multienzimático de fácil formação.

A seleção dos microrganismos para a biotransformação pode ser considerada o passo mais crítico em todo o procedimento. A escolha destes deve ser feita analisando os resultados disponíveis na literatura para compostos semelhantes ao que se pretende estudar. Obtêm-se as cepas sugeridas pela literatura junto a outros pesquisadores ou em coleções de culturas de instituições de pesquisa. Na ausência de dados na literatura que indique o sistema enzimático desejável a reação em estudo, pode-se isolar microrganismos da natureza – solo, plantas, ambientes marinhos, e testá-los através de um processo empírico de seleção (triagem). Nessa seleção realizam-se experimentos em pequena escala com os microrganismos disponíveis e analisam-se os extratos brutos obtidos do caldo de fermentação, comparando-os a um controle ao qual não foi adicionado o substrato. Se houver a formação de novos metabólitos significa que aquele microrganismo realizou alguma transformação no substrato (GLAZER & NIKALDO, 1995).

Definido o microrganismo a ser empregado deve-se escolher a forma adequada para a adição do substrato. Pode-se adicioná-lo durante ou após a fase de crescimento da cultura. Durante a fase de crescimento do microrganismo ocorre a formação do seu complexo enzimático capaz de metabolizar os nutrientes. Se o composto de partida for adicionado nessa fase ele pode induzir a formação de enzimas normalmente não produzidas pelo microrganismo, sendo maiores as chances de um resultado positivo; esta metodologia denomina-se células em crescimento. Se a opção for adicionar o substrato após o desenvolvimento completo do microrganismo, denominado células em repouso, o microrganismo é inicialmente cultivado sob condições ótimas e a biomassa é separada por centrifugação ou filtração. Em seguida as células são transferidas para um outro meio de cultura simples - como água e glucose - e o substrato é adicionado. A composição simples do meio de cultura facilita o isolamento do produto, porém, a transformação depende de enzimas já formadas (HANSON, 1992).

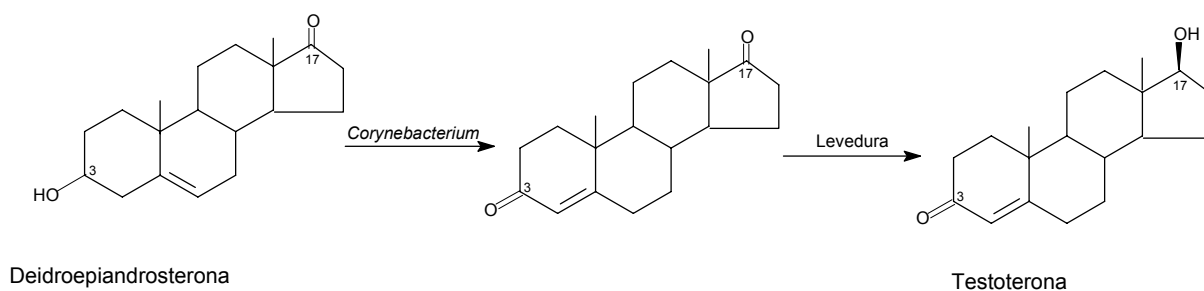
Outro fator a ser considerado para que a biotransformação ocorra é a necessidade do substrato entrar em contato com as enzimas produzidas pelo

microrganismo. As enzimas podem ser extracelulares, nesse caso estão dispersas no meio de fermentação, ou intracelulares, no interior da célula. Nesse último caso, o substrato deve ser capaz de atravessar a membrana celular do microrganismo. Em casos em que o substrato é insolúvel em água é necessário realizar uma dispersão no meio líquido da melhor forma possível. Para isso o substrato é dissolvido em solventes hidrossolúveis e adicionado à cultura do microrganismo. A dispersão conseguida é, na maioria dos casos, suficiente para que o composto orgânico entre em contato direto com a enzima que irá transformá-lo (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

Os produtos finais da biotransformação são normalmente extracelulares e são encontrados em suspensão no caldo da fermentação. Normalmente não se separam as bactérias nem leveduras previamente do caldo da fermentação, enquanto o micélio dos fungos é eliminado por filtração. Nesse caso o material celular deve ser lavado repetidas vezes com água e solvente orgânico porque uma parte significativa dos produtos formados pode estar adsorvida nas células do micélio. Dependendo da solubilidade dos produtos a recuperação pode ser feita por extração com solventes apropriados, precipitação, adsorção em trocadores de íons ou, para substâncias voláteis destilação direta a partir do meio de cultivo. Para a purificação dos metabólitos se utilizam as diversas técnicas cromatográficas (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

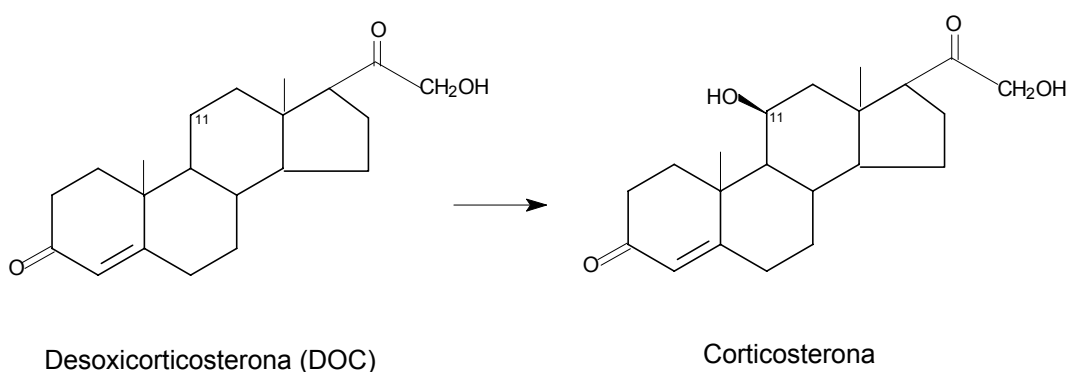
## **1.2 APLICAÇÕES DA BIOTRANSFORMAÇÃO**

Os estudos com esteróides podem ser referidos como marco histórico nesta área. Conforme Stoudt (1960), em 1937 Mamoli e Vercellone prepararam a testosterona a partir da deidroepiandrosterona utilizando microrganismos, conforme esquema 2. Este trabalho foi de grande importância, pois viabilizou o desenvolvimento da produção dos hormônios sintéticos.



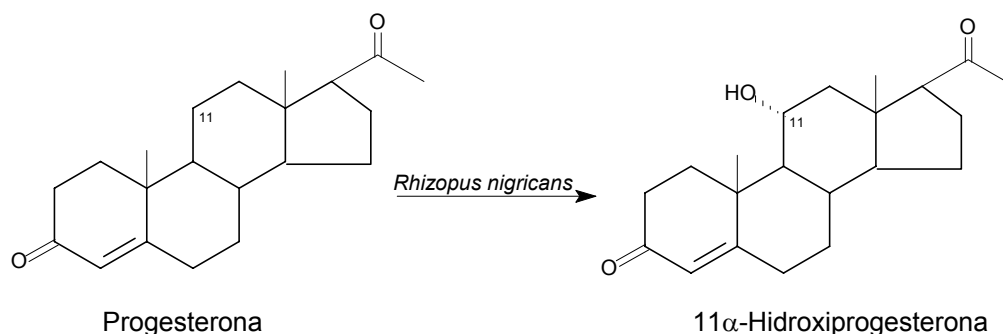
## ESQUEMA 2: BIOTRANSFORMAÇÃO DA TESTOSTERONA.

O mais notável trabalho desenvolvido nesta época foi o de Hench *et al.* (1949). Estes pesquisadores conseguiram produzir a corticosterona, um derivado da cortisona, através da ação de microrganismos na deoxicorticosterona. Com a transformação microbiana foi possível funcionalizar o C-11 de forma muito mais simples que a proposta por síntese química, conforme mostra o esquema 3. A corticosterona possui ação anti-inflamatória, por isso esta metodologia teve aplicação industrial tanto pela Merck (1949) quanto pela Schering (1951) (CHARNEY & HERZOG, 1967).



## ESQUEMA 3: BIOTRANSFORMAÇÃO DA DEOXCORTICOSTERONA.

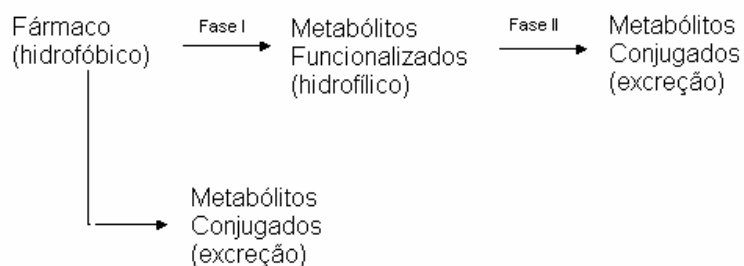
De forma semelhante Peterson & Murray, 1952, realizaram a hidroxilação na posição 11 $\alpha$ - da progesterona com o fungo *Rhizopus nigricans*, que levou a formação da 11 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, conforme esquema 4. Esta reação foi decisiva para a síntese de hormônios adrenocortícoídes de forma economicamente viável (STOUDT, 1960).



#### ESQUEMA 4: BIOTRANSFORMAÇÃO DA 11 $\alpha$ -HIDROXIPROGESTERONA

A partir destes estudos, as transformações microbianas tornaram-se muito importantes e passaram a ter grande aplicação na indústria farmacêutica no desenvolvimento de drogas, principalmente quando se deseja obter fármacos enantiomericamente puros.

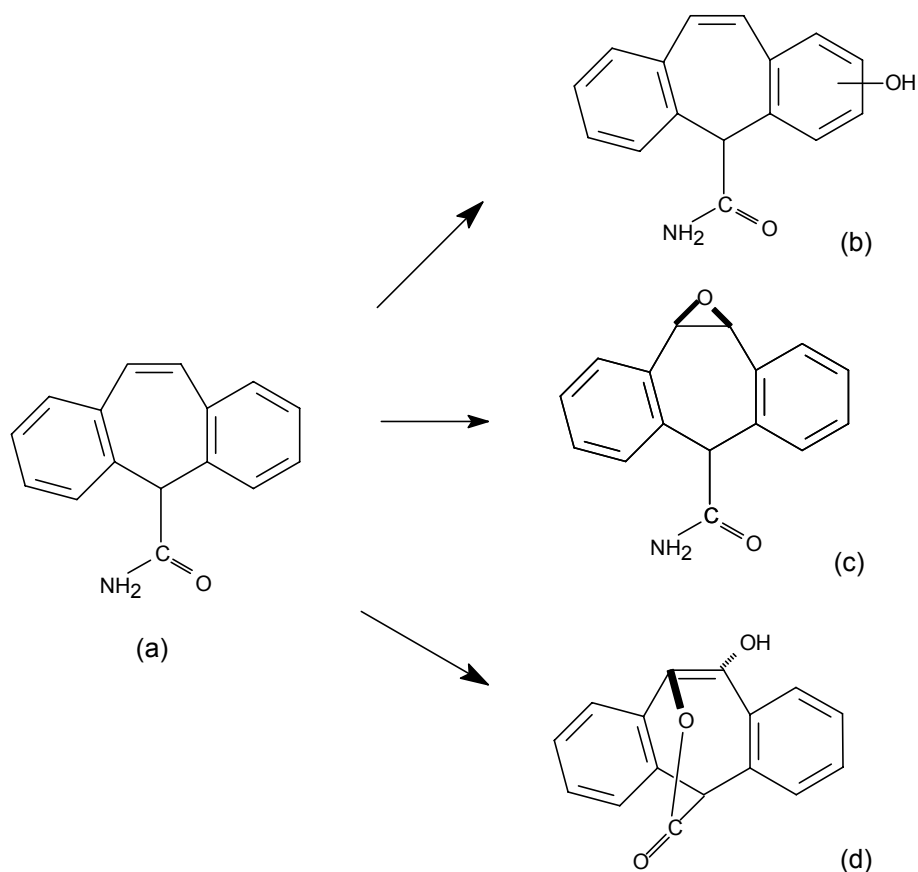
Outra aplicação interessante para as transformações microbianas é a comparação entre os metabólitos produzidos pelos microrganismos e os gerados pelo organismo humano após a ingestão de medicamentos. O metabolismo dos fármacos no organismo humano se dá por transformações enzimáticas em duas fases. Como mostra o esquema 5; a primeira fase do metabolismo, denominada biotransformação (fase I) é onde se dá a funcionalização do composto e engloba reações de oxidação, redução e hidrólise, transformando-o em derivados mais polares. Essas reações podem aumentar a atividade da droga ou torná-la tóxica. A fase II – etapa de conjugação – envolve reações de glicuronidação, sulfatação, acilação, metilação e a formação de adutos com glutathione, consiste na síntese do composto com grupos que aumentam sua afinidade por água – hidrofílicos; ou o tornam bioinativo, facilitando sua excreção (AZERAD, 1998; BARREIRO *et al.*, 1996).



ESQUEMA 5: METABOLISMO DOS FÁRMACOS EM MAMÍFEROS.

O resultado final dessa biotransformação leva a formação de metabólitos em pequenas quantidades nos tecidos humanos e nos seus produtos de excreção como a urina (VÉZINA,1991).

Conforme estudos desenvolvidos por Sehgal e Vézina em 1967 (VÉZINA, 1991) com o anticonvulsivo 5-H-dibenzo(a,d)cicloheptano-5-carboxamida (composto a) observaram que diversos microrganismos eram capazes de biotransformá-lo. Selecionaram a bactéria *Streptomyces lavendulae* e obtiveram quantidades consideráveis dos compostos b,c,d conforme mostra esquema 6. Os mesmos compostos haviam sido isolados na urina de cachorros nos estudos farmacológicos envolvendo animais.



ESQUEMA 6: BIOTRANSFORMAÇÃO DO ANTICONVULSIVO 5-H-DIBENZO(a,d) CICLOEPTANO-5-CARBOXAMIDA

Observações sistemáticas das hidroxilações ocorridas pela ação de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) em vários compostos aromáticos levaram a proposta apresentada por Smith & Rosazza na década de 1970, de que o sistema de biotransformação desses é muito semelhante ao que acontece nos mamíferos na fase I descrita acima (AZERAD, 1998). Portanto, os sistemas microbianos podem ser uma alternativa aos testes de novas drogas realizados em sistemas tradicionais envolvendo animais, pois estes apresentam a desvantagem de produzir os metabólitos em pequenas quantidades o que dificulta a elucidação de suas estruturas e testes toxicológicos. (AZERAD, 1998; CHATTERJEE *et al.*, 2000). Segundo os mesmos autores, os modelos utilizando microrganismos apresentam como vantagens:

- o meio de cultura é facilmente preparado e possui baixo custo;



- a concentração utilizada do fármaco é muito mais alta (0,2 – 0,5 g/L) do que a empregada em tecidos de animais;
- em certos casos, o microrganismo pode metabolizar com facilidade o composto, formando 20 – 200 mg/L do derivado, isto facilita seu isolamento e a identificação.

A maior desvantagem apresentada é a necessidade de se ter em estoque os microrganismos; mesmo assim, é mais barato e simples do que a cultura de células ou animais.

Azerad (1998) desenvolveu uma revisão em que compara os metabólitos obtidos com diversos fármacos, esteróides, antibióticos e alcalóides, em testes "in vivo" com animais e por transformação microbiana mostrando a semelhança entre os dois casos. Os fungos mais utilizados nestes estudos foram *Cunninghamella* e *Beauveria* spp., e as bactérias: *Streptomyces*, *Norcadia*, *Myco-* ou *Corynebacteria*, *Actinoplanes* e *Pseudomonas*. Isso comprova que as transformações microbianas têm se tornado um instrumento importante, tanto para prever a presença e a natureza do metabólito, como para prepará-los em maior quantidade para a elucidação de sua estrutura e estudos toxicológicos. Esta metodologia também é utilizada para encontrar novos compostos ativos ou que sirvam como intermediários para a síntese química (VÉZINA, 1991).

### **1.3 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS**

O isolamento de microrganismos do ambiente, sejam terrestres ou aquáticos, vêm despertando interesse dos pesquisadores, pois se estima que um número muito pequeno de espécies é conhecido.

A incidência de microrganismos nas plantas ocorre pela infecção natural no campo, favorecida pelo clima úmido, sendo que o seu isolamento pode ser considerado o passo inicial para a compreensão do aparecimento de metabólitos secundários nas plantas e a ativação de enzimas específicas nos fungos (CASA *et al.*, 1998).

Os microrganismos epifíticos (fungos ou bactérias) são aqueles que vivem sob outro ser vivo e os endófitos são aqueles que vivem em associação íntima com plantas hospedeiras vivas e saudáveis, colonizando os tecidos vegetais. Uma vez que os microrganismos endofíticos convivem com os epifíticos e os patogênicos, o

isolamento dos mesmos deve ser feito a partir do interior de tecidos e órgãos sadios, com uma desinfecção da superfície dos fragmentos da planta, evitando-se assim os patogênicos e epifíticos. Conforme explica Neto *et al.* (2002) a distinção de endo/epifítico e patógeno é didática, pois muitos microrganismos epifíticos podem eventualmente penetrar no interior da planta, enquanto os endofíticos, para penetrar no hospedeiro, têm primeiro que se localizar na sua superfície. Por outro lado, um patógeno pode conviver em harmonia com a planta e, após um desequilíbrio ambiental, causar-lhe danos.

Vários estudos realizados em 1970 demonstraram que os microrganismos endofíticos possuem algumas funções imprescindíveis para a defesa de seus hospedeiros. Confirmou-se a hipótese de que estes microrganismos vivem numa interação mutualística, recebendo nutrientes e proteção da planta hospedeira e apresentando a capacidade de estimular o crescimento das plantas por mecanismos diretos (fixação de nitrogênio e/ou produção de fitormônios) e por mecanismos indiretos - produzindo compostos químicos como enzimas, alcalóides e antibióticos que atuam como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos, além de poder funcionar no controle de insetos e proteger a planta contra herbívoros. Um exemplo clássico da redução da herbivoria foi estudado nas gramíneas dos gêneros *Lolium* e *Festuca* em associação com o fungo *Neotyphodium*, em que ocorre a produção de alcalóides que reduzem a atratividade da planta, aumentam a suscetibilidade do inseto a doenças ou inibem seu desenvolvimento. (AZEVEDO *et al.*, 2000)

O emprego destes microrganismos nas práticas agrícolas se dá no controle biológico de doenças e pragas nas plantações. Normalmente, o mecanismo de ação é por meio da indução de resistência sistêmica (IRS). Neste tipo de controle, a penetração ativa do microrganismo endofítico induz a planta hospedeira a sintetizar compostos que atuam sobre o patógeno ou alteram a morfologia vegetal.

Estudos realizados por Stierle *et al.* (1993) mostraram que o fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, encontrado no interior da planta *Taxus brevifolia*, era capaz de produzir o taxol, um complexo diterpenóide com ação antitumoral e de grande interesse para a indústria farmacêutica. Mais tarde, Strobel *et al.* (1996), verificaram que outro fungo endofítico *Pestalotiopsis microspora* isolado da *T. wallachiana* também produzia o taxol. “Com a descoberta de que fungos endofíticos também

podiam produzir o taxol visualizou-se um novo processo talvez mais eficiente e menos dispendioso para a produção de fármacos.” (NETO *et al.*, 2003) Desde então, fungos e bactérias endofíticas tem despertado grande interesse como produtores de metabólitos secundários com atividade terapêutica como novos antibióticos e antifúngicos, assim como a interação entre a planta e o microrganismo pois se acredita que muitas substâncias bioativas que ocorrem nas plantas podem ser produzidas por estes microrganismos associados, porém a exata relação física e bioquímica entre os endófitos e a planta permanece obscura (STROBEL; 2003).

#### 1.4 ÁCIDO BETULÍNICO E DERIVADOS

O ácido betulínico ( I; ácido 3 $\beta$ -hidroxilup-20(29)-en-28-óico), ácido betulônico (II; ácido 3-oxolup-20(29)-en-28-óico) e betulina ( III; lup-20(29)-ene-3 $\beta$ , 28-diol) são triterpenos pentacíclicos de esqueleto lupânico (Figura 1) presentes em diversas plantas.

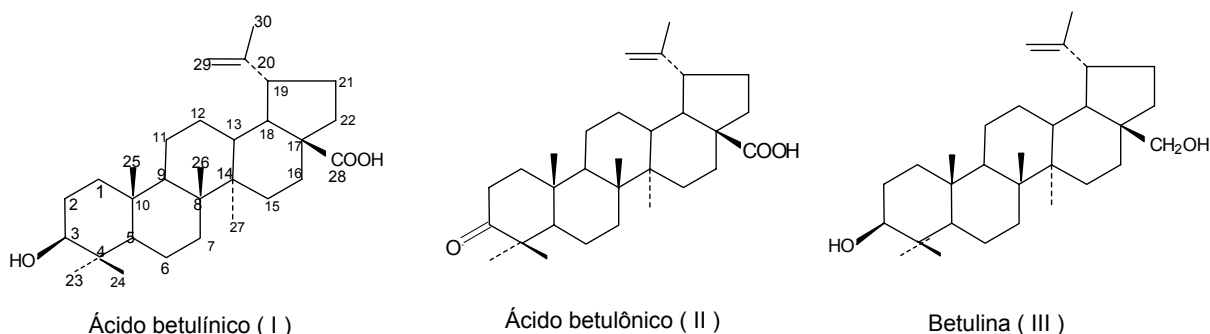


FIGURA 1: ESTRUTURA DO ÁCIDO BETULÍNICO E SEUS DERIVADOS

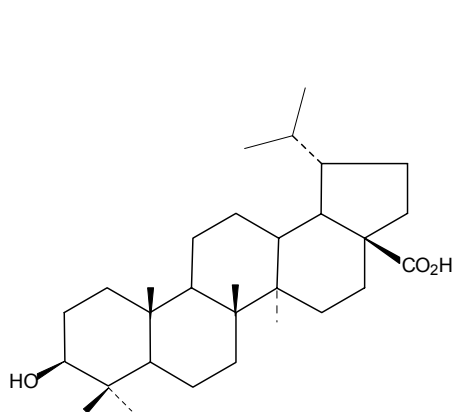
O ácido betulínico apresenta atividades farmacológicas importantes. Fujioka *et al.* (1994) e Evers *et al.* (1996) associaram este composto a ação anti-HIV, sendo um potente inibidor da replicação viral. Pisha *et al.* (1995) descreveram a atividade do ácido betulínico como inibidor seletivo do melanoma humano, através de indução da apoptose; posteriormente foi demonstrado que tal ação se devia à inibição da aminopeptidase N. (MELZIG & BORMANN, 1998). Posteriormente, comprovou-se que o ácido betulínico atua num amplo espectro de células tumorais tais como: neuroblastoma; tumores cerebrais e leucemia (SCHIMIDT *et al.*, 1997; FULDA *et*

*al.*,1997; FERNANDES,*et al.*, 2003; HATA, *et al.*, 2003; YOGEEESWARI & SRIRAM, 2005). Possui ainda atividade frente ao *Plasmodium falciparum*, vetor causador da malária, sendo eficiente no tratamento desta doença (BRINGMANN *et al.*,1997).

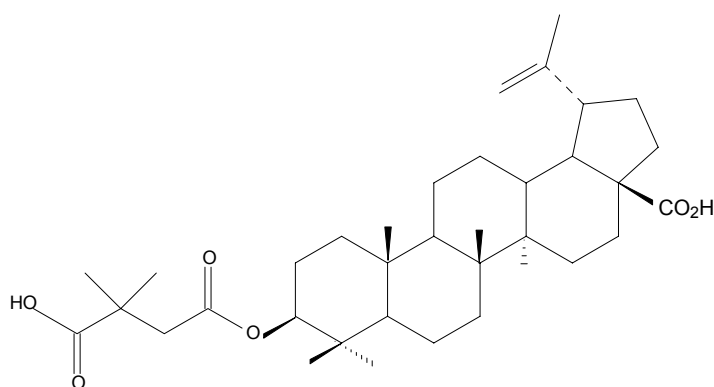
O ácido betulônico (II) apresenta ação frente ao melanoma (KIM *et al.*, 1998) e também atua como anti-inflamatório, além de ser ativo contra o vírus da herpes (PAVLOVA *et al.*, 2003)

A betulina (III) apresenta propriedade anti-inflamatória (RECIO *et al.*,1995) e efeitos inibidores ao vírus Epstein – Barr (EBV-EA), agente etiológico do linfoma de Burkitt e carcinoma nasofaríngeo (AKIHISA *et al.*,2002).

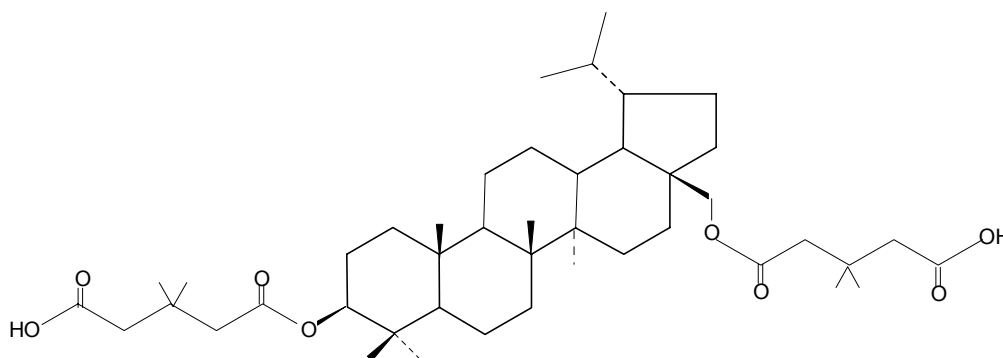
A fim de otimizar as atividades farmacológicas descritas acima, derivatizações por via química já foram realizadas. Os compostos descritos anteriormente são suscetíveis a modificações nas posições: hidroxila/carbonila C-3, alqueno C-20 e a carboxila/hidroxila C-28. Nesse sentido, vários estudos foram desenvolvidos por Fujioka *et al.* (1994); Kashiwada *et al.* (1996; 1998a; 1998b; 2000; 2001) e Kim *et al.*(1998; 1999; 2001). De todos os compostos sintetizados, poucos apresentaram melhoria na atividade frente ao HIV e/ou ao melanoma. Destacam-se o ácido diidrobetulínico (IV), o ácido 3-O-(3',3'-dimetilsuccinil)-betulínico (V) e a 3,28-di-O-(3',3'-dimetilglutaril) diidrobetulina (VI) (Figura 2):



Ácido diidrobetulínico (IV)



Ácido 3-O-(3', 3'-dimetilsuccinil) betulínico (V)



3,28-di-O-(3',3'-dimetilglutaril) diidrobetulina (VI)

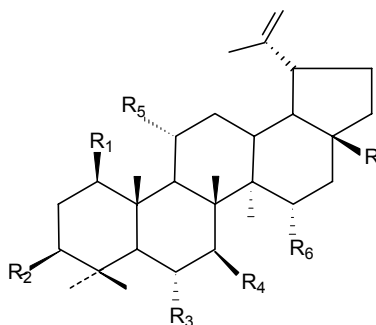
## FIGURA 2: DERIVADOS DO ÁCIDO BETULÍNICO OBTIDOS VIA QUÍMICA.

Verificou-se através desses estudos que para a atividade anti-HIV é essencial a hidroxila na posição  $3\beta$  e que modificações no anel A, assim como a maioria das modificações em C-30, reduzem a atividade (FUJIOKA *et al.*, 1994). Já para ação frente ao melanoma a presença da carboxila em C-28 é essencial (KIM *et al.*, 1998).

Na tentativa de elucidar o metabolismo do ácido betulínico no organismo humano foram utilizados sistemas envolvendo microrganismos para prever e preparar potenciais metabólitos (CHATTERJEE *et al.*, 1999, 2000; KOUZI *et al.*, 2000) ou na busca de derivados mais potentes (AKIHISA *et al.*, 2002).

No estudo realizado por Chatterjee *et al.* (1999), o ácido betulínico foi biotransformado pelo fungo *Cunninghamella* spp. NRRL 5695, sendo isolado 28-O- $\beta$ -D-glucopiranosil  $3\beta$ -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oato (VII) conforme mostra a figura 3. Kouzi *et al.* (2000) submeteram o mesmo substrato a três microrganismos diferentes: *Bacillus megaterium* ATCC 14581, resultando no ácido betulônico (II) e dois novos metabólitos ácido  $3\beta,7\beta$ -diidroxi-lup-20(29)-en-28-óico (VIII) e ácido  $3\beta,6\alpha,7\beta$ -triidroxi-lup-20(29)-en-28-óico (IX); *Cunninghamella elegans* ATCC 9244 produziu o ácido  $1\beta,3\beta,7\beta$ -triidroxi-lup-20(29)-en-28 óico (X) e *Mucor mucedo* UI 4605 forneceu o composto VIII novamente. Os mesmos pesquisadores, continuaram o estudo (Kouzi *et al.*, 2000) com o ácido betulínico, submetendo-o a uma cepa diferente de *B. megaterium* ATCC 13368 resultando em quatro metabólitos: ácido betulônico (II); ácido 3-oxo- $11\alpha$ -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico(XI); ácido  $1\beta$ -hidroxi-3-oxo-lup-20(29)-

em-28-óico (XII) e ácido 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -triidroxi-lup-20(29)-en-28 óico (XIII). Todos os derivados foram testados frente ao melanoma.



Estrutura	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	ED <sub>50</sub> (MEL-1)	ED <sub>50</sub> (MEL-2)
I	COOH	H	OH	H	H	H	H		1,29
II	COOH	H	=O	H	H	H	H		0,9
III	CH <sub>2</sub> OH	H	OH	H	H	H	H		>20
VII	COO- $\beta$ -D-glu	H	OH	H	H	H	H	> 20	> 20
VIII	COOH	H	OH	H	OH	H	H	17,1	7,2
IX	COOH	H	OH	OH	OH	H	H	10,9	16,8
X	COOH	OH	OH	H	OH	H	H	> 20	> 20
XI	COOH	H	=O	H	H	OH	H	> 20	0,2
XII	COOH	OH	=O	H	H	H	H	> 20	0,3
XIII	COOH	H	OH	H	OH	H	OH	> 20	> 20

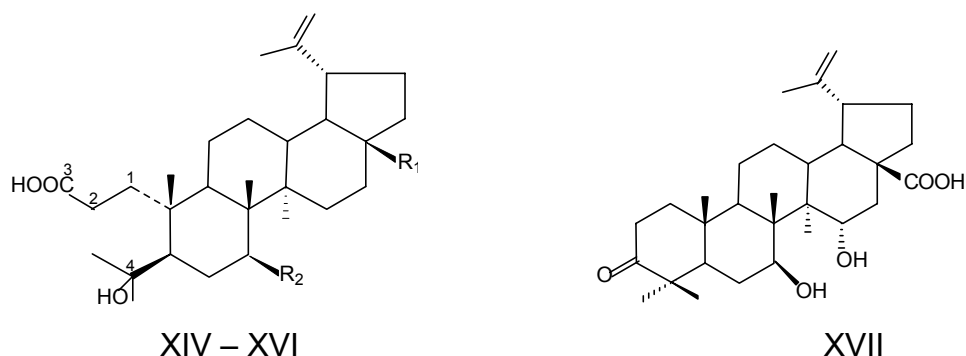
ED<sub>50</sub> (MEL-1; linfonodo) = concentração que inibe o crescimento da célula de melanoma em 50% -  $\mu$ g/mL

ED<sub>50</sub> (MEL-2; fluido pleural) = concentração que inibe o crescimento da célula de melanoma em 50%- $\mu$ g/mL

FIGURA 3: ESTRUTURA DOS DERIVADOS DO ÁCIDO BETULÍNICO POR BIOTRANSFORMAÇÃO.

Akihisa *et al.* (2002) realizaram a biotransformação da betulina (III) e do ácido betulônico (II) pelo fungo *Chetomium longirostre* e obtiveram quatro novos metabólitos: ácido 4,28-diidroxi-3,4-seco-lup20(29)-en-3 óico (XIV); ácido 4-hidroxi-3,4-seco-lup-20(29)-ene-3,28-dióico (XV) derivados de III; ácido 4,7 $\beta$ ,17-triidroxi-3,4-seco-28-norlup20(29)-en-3 óico (XVI) e ácido 3 oxo-7 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diidroxilup-20(29)-en-28 óico (XVII) derivados do composto II, (Figura 4). Esses metabólitos mostraram maior potencialidade na inibição de tumores que os compostos iniciais, visto que mostraram efeitos inibidores ao teste para o vírus Epstein-Barr (EBV-EA). O fungo

estudado promoveu a oxidação da estrutura com conseqüente abertura do anel A (Figura 4):



Estrutura	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
XIV	CH <sub>2</sub> OH	H
XV	COOH	H
XVI	OH	OH

FIGURA 4: ESTRUTURA DOS DERIVADOS DA BETULINA E DO ÁCIDO BETULÔNICO POR BIOTRANSFORMAÇÃO.

Em vista dos estudos citados, pode-se comprovar que o ácido betulínico e seus derivados se apresentam como potenciais fármacos para a indústria farmacêutica. Essas moléculas são candidatas ideais para a obtenção de derivados via biotransformação, devido à complexidade e ao grande número de carbonos não ativados, geralmente inacessíveis a reagentes químicos tradicionais (ABRAHAM *et al.*, 1992).

Isso justifica os esforços na continuidade da pesquisa por derivados dos substratos que simulem o metabolismo da droga no organismo humano, ou na busca por derivados que tenham sua potencialidade aumentada, seletividade e/ ou redução de efeitos colaterais em relação à droga original.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O ácido betulínico (I), ácido betulônico (II) e betulina (III) são produtos naturais com importantes propriedades farmacológicas cuja complexidade das moléculas torna a biotransformação uma alternativa para a obtenção de seus derivados. Dentro desse contexto, esse trabalho visa isolar e caracterizar os derivados obtidos por transformações microbianas dos substratos propostos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Baseado na importância farmacológica dos substratos propostos, buscou-se obter seus derivados pela biotransformação por fungos, para isso foi necessário:

- Obter o ácido betulínico da casca de *Platanus orientalis* L. (Platanaceae), o ácido betulônico por derivatização química a partir do ácido betulínico e a betulina adquirida da Sigma-Aldrich.
- Fazer o estudo fitoquímico do *P. orientalis* visando investigar a presença ou não do ácido betulônico e betulina.
- Isolar e identificar os fungos epifíticos e endofíticos associados ao *P. orientalis*.
- Selecionar os fungos que promovem reações de óxido-redução nos substratos propostos.
- Realizar a biotransformação do ácido betulínico e derivados em escala preparativa com os fungos selecionados na etapa anterior.
- Isolar e caracterizar os metabólitos produzidos.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ESPECIFICAÇÕES GERAIS DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

a) Para as extrações e sistemas cromatográficos foram utilizados solventes de grau comercial, os quais foram destilados. Para o uso em CLAE foi utilizado metanol (Merck MXO 488-1), acetonitrila (Merck AXO 142-1) e água ultra-pura com pH ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico.

b) O tipo da fase estacionária utilizada variou de acordo com o tipo de separação:

- para cromatografia líquida a vácuo e por gravidade utilizou-se sílica Si-60 (Merck, art.7744 e 7736), partículas de 5 - 40  $\mu\text{m}$  e sílica partícula 2 - 25  $\mu\text{m}$  (Aldrich, 288500)

- para cromatografia em camada delgada centrífuga (CCDC) utilizou-se sílica Si-60 PF254 com sulfato de cálcio (Merck, art.7749). Os rotores foram preparados com uma camada de sílica de espessura de 2 mm.

- para cromatografia em camada delgada (CCD), utilizou-se como adsorvente Si-60 F254 (Merck, art.5554) com espessura de 0,2 mm.

c) As revelações dos cromatogramas em CCD foram feitas com solução de ácido sulfúrico – metanol (1:1) e aquecimento.

d) A cromatografia em camada delgada centrífuga foi realizada em aparelho Chromatotron, com velocidade de fluxo do eluente igual a 1 mL/min.

e) Para cromatografia líquida de alta eficiência analítica – CLAE foi utilizado um sistema da marca Varian constituído de bomba quaternária modelo 9012Q, detetor de fotodiodo modelo 9065, injetor automático marca Rainin modelo AI-200, e o sistema foi controlado pelo programa Star versão 5.3. A coluna utilizada foi C18 de 5  $\mu\text{m}$  da marca Rainin. Para preparativa foi utilizada coluna C18 de 10  $\mu\text{m}$  da marca Rainin.

f) Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram registrados em espectrômetros da marca Bruker Avance DRX 400 e Bruker Avance DPX 200, operando a 400 MHz para hidrogênio e utilizando como solvente clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), gotas de piridina ou metanol, se necessário, e padrão de referência interna o tetrametilsilano

(TMS). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

g) Os espectros no IV foram registrados em aparelho Excalibur série Bio-Rad FTS3500GX. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de brometo de potássio (KBr) e as absorções expressas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

h) Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Quimis Q340523.

i) A rotação óptica foi determinada em polarímetro Bellingham Stanley modelo D.

j) Para esterilização dos materiais foi utilizada autoclave vertical Phoenix. Os fungos foram repicados em capela de fluxo laminar - Trox technik M536-AD4.

k) Os experimentos foram realizadas em agitador-incubador orbital Tecnal TE-421 a aproximadamente 28°C e 150 rpm.

l) Os meios de cultura utilizados da marca Biobrás diagnósticos e a glucose anidra da Lafan Química Fina Ltda.

m) Os fungos endofíticos: *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp. e *Penicillium* sp. foram cedidos pela Prof. Dra. Ida Chapaval Pimentel do Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná.

### **3.2 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO**

A casca do caule de *P. orientalis* L. (Platanaceae) foi coletada de diversos indivíduos no município de Curitiba, Paraná. O material botânico foi identificado pelo Prof. Dr. Olavo Guimarães e uma exsicata foi preparada e depositada no Herbário da UFPr sob o número 47812.

### **3.3 OBTENÇÃO DOS SUBSTRATOS**

#### **3.3.1 Ácido Betulínico**

O ácido betulínico foi isolado da casca do caule de *P. orientalis*. O isolamento desse ácido já foi alvo de patente (DRAGER, *et al.*, 1998; SAUTER, 2003), porém foi desenvolvida uma nova metodologia de extração mais rápida, com maior rendimento, resultando redução de custo.

A extração realizada em aparelho soxhlet, inicialmente com solvente de baixa polaridade (hexano) seguida pelo de média polaridade (diclorometano). A obtenção do ácido betulínico se deu pela cristalização do extrato de média polaridade em etanol.

### 3.3.2 Ácido Betulônico

O ácido betulônico foi obtido por oxidação do resíduo da cristalização rico em ácido betulínico. Como oxidante utilizou-se o reagente de Jones (VOGEL, 1989).

#### Procedimento:

Preparação do reagente de Jones:

O trióxido de cromo (267g, 2,67mol) foi dissolvido em 400 mL de água. Ácido sulfúrico concentrado (230 mL) foi adicionado com resfriamento em banho de gelo. A solução foi diluída com água até 1 litro (reagente 8N).

Preparação do ácido betulônico:

O reagente de Jones (10 mL) previamente preparado foi adicionado gota a gota na solução do extrato de ácido betulínico (1,0 g, 2,26 mmol) em acetona (50 mL) resfriada a 0°C. Esta mistura permaneceu sob agitação por 1,5 hora a 0°C. Adicionou-se metanol (25 mL) mantendo a agitação por 5 minutos, então colocou-se água (40 mL). A acetona foi evaporada no rotaevaporador e o resíduo aquoso foi extraído com acetato de etila (40 mL, 2 vezes).

Em funil de separação a fase orgânica foi separada da aquosa, sendo necessário lavar a fase orgânica com água (20 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (15 mL). Foi adicionado sulfato de magnésio ou sódio anidro, filtrado e evaporado o solvente orgânico em rotaevaporador.

Com a finalidade de se obter o ácido betulônico com alto grau de pureza o resíduo foi cromatografado em coluna a vácuo tendo como fase móvel hexano - acetato de etila (9:1). O rendimento foi de 67% do ácido betulônico

### 3.3.3 Betulina

Para os ensaios iniciais a betulina foi adquirida da Sigma-Aldrich

### **3.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS EPIFÍTICOS E ENDOFÍTICOS**

O isolamento e identificação dos fungos endo e epifíticos presentes na casca de *P. orientalis* foi realizada de acordo com metodologia específica.

Para cada experimento foram utilizadas 800 amostras de cascas cortadas em pequenos pedaços e plaqueadas em dois meios de cultura: Batata-dextrose-ágar (BDA) e Sabouraud (SDA) com adição de solução etanólica de tetraciclina (100µg/ L de meio de cultura).

Para o isolamento dos fungos epifíticos, as amostras foram previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio 3% durante trinta segundos, posteriormente enxaguadas em água destilada esterilizada.

Para o isolamento dos fungos endofíticos, as amostras foram previamente parafinadas nas extremidades, desinfetadas em solução de etanol a 70% durante um minuto; com hipoclorito de sódio 3% por quatro minutos, novamente em solução etanólica 70% por trinta segundos, posteriormente enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Após a desinfecção, quatro amostras de aproximadamente 5 x 5 mm foram colocadas em placas de Petri de 9 cm com os meios citados e mantidas em estufa a aproximadamente 28°C durante 3 a 5 dias.

O isolamento dos fungos foi feito pela transferência dos micélios ou conídios em tubos de ensaio com meio BDA inclinados e mantidos sob refrigeração.

A identificação dos isolados foi realizada pela Prof. Dra. Ida Chapaval Pimentel do Departamento de Patologia Básica da UFPr, por meio da observação das estruturas de reprodução (sexual e assexual) dos fungos, utilizando o método de cultura em lâmina ou técnica do microcultivo (KERN & BLEVINS, 1999) e de acordo com literatura especializada (ELLIS, 1976; BARNETT & HUNTER, 1986; ARX, 1974).

### 3.5 BIOTRANSFORMAÇÃO EM ESCALA ANALÍTICA – SCREENING

#### 3.5.1 Repicagem das cepas

Os fungos foram mantidos sob refrigeração em meio de cultura sólido BDA. A cada 15 dias um novo meio de cultura foi preparado e uma nova inoculação foi feita.

#### 3.5.2 Fungos utilizados

Nos experimentos em escala analítica foram empregados os fungos isolados no item 3.4 e os disponíveis no laboratório num total de 25 sendo 22 gêneros diferentes, conforme mostra a tabela 2:

TABELA 2: FUNGOS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO EM ESCALA ANALÍTICA.

Fungo	Origem	Fungo	Origem
<i>Alternaria</i> sp.	<i>P.orientalis</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>P.orientalis</i>
<i>Arthrotrys</i> sp.	<i>P.orientalis</i>	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>P.orientalis</i>
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>P.orientalis</i>	<i>Penicillium</i> sp.	milho
<i>Aspergillus nidelans</i>	----	<i>Penicillium citrinum</i>	----
<i>Aspergillus niger</i>	<i>P.orientalis</i>	<i>Pestalotia</i> sp.	<i>P.orientalis</i>
<i>Chaetophoma</i> sp.	<i>P.orientalis</i>	<i>Phoma</i> sp.	<i>P.orientalis</i>
<i>Cladosporium</i> sp.	milho	<i>Rhizomucor</i> sp.	<i>P.orientalis</i>
<i>Colletotrichum</i> sp.	milho	<i>Rhizopus</i> sp	<i>P.orientalis</i>
<i>Curvularia</i> sp	<i>P.orientalis</i>	<i>Stachibotrys</i> sp.	<i>P.orientalis</i>
<i>Dematium</i> sp.	<i>P.orientalis</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>P.orientalis</i>
<i>Dreschelera</i> sp.	<i>P.orientalis</i>	<i>Trichophyton</i> sp.	<i>P.orientalis</i>
<i>Fusarium</i> sp.	<i>P.orientalis</i>	<i>Trichothecium</i> sp.	----
<i>Gibberella</i> sp.	----		

---- procedências diversas

#### 3.5.3 Experimentos em escala analítica

Cada fungo foi inoculado em quatro erlenmeyers de 250mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido estéril, constituído de glucose (10,00 g/L), “corn steep liquor” (8,00 g/L) e extrato de levedura (2 g/L). Em seguida os frascos foram levados a um agitador-incubador orbital e mantidos a aproximadamente 28°C e 150 rpm por

48 horas. Após esse período, ao primeiro frasco foi adicionado 0,5 mL de uma solução do ácido betulínico em DMSO (10 mg/mL); ao segundo 0,5 mL de solução de ácido betulônico em acetona (10 mg/mL) e ao terceiro 0,5 mL de uma solução de betulina em propanol (10 mg/mL). Os frascos aos quais não foi adicionado nenhum substrato servem de controle negativo. Após a adição dos substratos, a fermentação foi conduzida por 7 dias no agitador-incubador nas mesmas condições anteriores.

Terminada a fermentação o caldo foi filtrado em funil de buchner, lavou-se o micélio com acetato de etila (20 mL, 2 vezes) e água (20 mL, 2 vezes). Em funil de separação a fase orgânica foi separada da aquosa, sendo que na fase aquosa adicionou-se 20 mL de acetato de etila (3 vezes). A fase orgânica foi evaporada em rotaevaporador e analisada em CCD; a aquosa foi descartada.

#### **3.5.4 Análise em CLAE**

Após análise prévia em CCD as biotransformações que produziram novos metabólitos tiveram seus resultados confirmados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fase móvel empregada em CLAE era composta de acetonitrila (A) e água com pH ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico (B). A análise foi realizada utilizando-se eluição isocrática (0-10 minutos, solução A: 40% e solução B: 60%) e eluição gradiente (10-12 minutos, solução A: 100%) permanecendo nessas condições até 20 minutos. Fluxo constante de 1 mL/min.; coluna C18 com partículas de 5 µm a temperatura de 25 °C; volume de injeção de 20 µL e detecção realizada em 205 nm.

Os fungos que produziram novos metabólitos foram selecionados para os experimentos em escala preparativa.

### **3.6 BIOTRANSFORMAÇÃO EM ESCALA PREPARATIVA**

#### **3.6.1 Experimentos em escala preparativa**

Os fungos selecionados na etapa anterior, *Arthobotrys* sp., *Chaetophoma* sp., *Colletotrichum* sp., *Dematium* sp., foram pré-inoculados, separadamente, em 9 erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura estéril, colocados em um agitador-incubador orbital, mantidos a 28°C e 150 rpm por 48 horas. Após esse

período foram transferidos para erlenmeyers de 1000 mL contendo 200 mL de meio de cultura estéril e aproximadamente 80 mg do substrato escolhido, solubilizado adequadamente, foi adicionado a 8 frascos. Um dos frascos permaneceu como controle negativo. Após 7 dias os conteúdos dos frascos foram filtrados e o caldo foi extraído com acetato de etila. Os extratos foram analisados em CCD.

No experimento em escala preparativa atenção especial foi dada ao micélio, pois muito do substrato inicial e do metabólito produzido permaneceu dentro ou aderido ao micélio sendo necessário provocar a ruptura celular através da maceração do mesmo e imersão em acetato de etila por um dia ou em banho ultrassônico (BELTER *et al.*, 1988). Após esse período, o micélio foi filtrado e o solvente orgânico destilado.

### **3.6.2 Isolamento e identificação dos metabólitos**

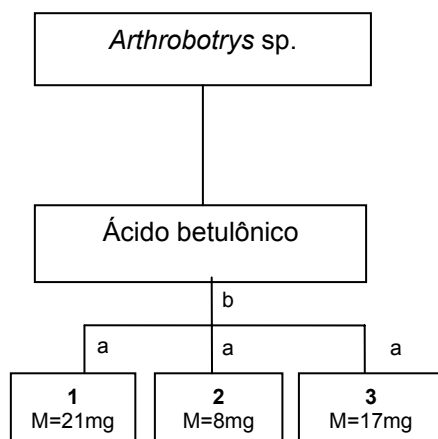
O isolamento dos metabólitos gerados pelas diversas biotransformações foi realizado por métodos cromatográficos conforme esquemas 7 a 10.

As substâncias isoladas foram identificadas pelos métodos espectroscópicos usuais: ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), DEPT, COSY, HMQC, infravermelho (IV), e determinação das constantes físicas: ponto de fusão e rotação óptica.

- **Biotransformação por *Arthrobotrys* sp.**

O experimento em escala preparativa com o ácido betulônico (1,28 g) e o fungo *Arthrobotrys* sp. produziu três metabólitos (Esquema 7).

Após a fermentação o caldo foi filtrado e extraído, obtendo-se 800 mg de extrato bruto. Este foi submetido a cromatografia líquida a vácuo sendo, utilizado 80 g de sílica, partículas de 2-25  $\mu\text{m}$ , em uma coluna de 3,5 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada com hexano; hexano: acetato de etila até acetato de etila 100% (gradiente de 10%) sendo coletadas frações de 50 mL, as quais foram analisadas por CCD. Seleccionadas as frações de interesse foram recromatografadas com eluição por gravidade para purificação das substâncias **1** (21 mg), **2** (8 mg) e **3** (17mg).



a – cromatografia sólido-líquida a gravidade

b - cromatografia sólido-líquida a vácuo

**ESQUEMA 7: METABÓLITOS GERADOS NA BIOTRANSFORMAÇÃO PELO *Arthrobotrys* sp. FRENTE AOS SUBSTRATOS.**

#### Substância 1

Aspecto físico: sólido amarelado

Ponto de fusão: 165-168°C

$[\alpha]^{25}_D$ : +17 (c= 0,6; MeOH)

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3438; 2956; 1694; Figura 24 (pág. 78)

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Figura 25 (pág. 79)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 21 (pág. 73); Figura 26 (pág. 79)

#### Substância 2

Aspecto físico: sólido branco

Ponto de fusão: 168-171°C

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3457; 2945; 1706; 1688; Figura 29 (pág. 81)

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Figura 30 (pág. 81)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 21 (pág. 73); Figura 31 (pág. 82)



### Substância 3

Aspecto físico: sólido branco

Ponto de fusão: 280-282°C

$[\alpha]^{25}$ : +20 (c= 0,3; MeOH)

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3467; 2945; 1706; Figura 34 (pág. 83)

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Figura 35 (pág. 84)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 21 (pág. 73); Figura 36 (pág. 84)

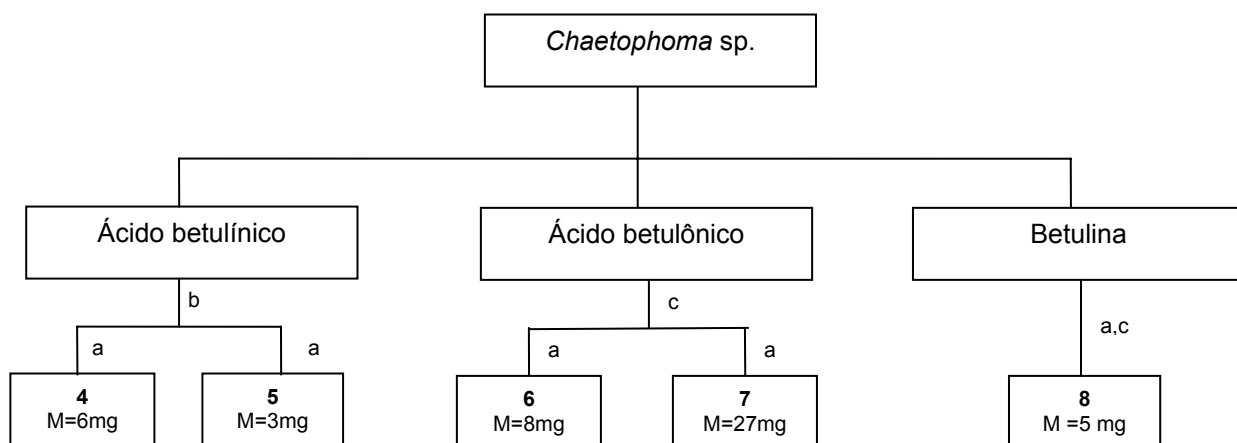
- **Biotransformação por *Chaetophoma* sp.**

O fungo *Chaetophoma* sp. foi utilizado para biotransformar os três substratos separadamente (Esquema 8).

Para o experimento preparativo com o fungo *Chaetophoma* sp. utilizou-se 618 mg de ácido betulínico. Após a fermentação o caldo foi filtrado e obteve-se 391 mg de extrato bruto. Esse extrato foi fracionado através de cromatografia líquida a vácuo com 40 g de sílica 2-25  $\mu\text{m}$ . A eluição foi realizada com hexano; hexano-acetato de etila até acetato de etila 100% (gradiente de 10%), sendo coletadas frações de 50 mL as quais foram analisadas por CCD. Recuperou-se 82,7 mg (13,4%) do material de partida e as substâncias **4** (5,8 mg) e **5** (3 mg) que foram recromatografadas a gravidade a fim de obtê-las com alto grau de pureza para análises espectroscópicas.

Na segunda fermentação do fungo *Chaetophoma* sp. foi utilizado 640 mg de ácido betulônico, que após filtração e extração resultou em 361 mg de extrato, o qual foi cromatografado por CCDC. A eluição foi realizada com hexano: acetato de etila (8:2); (6:4); (1:1). Dessa forma foram recuperados 63,4 mg de ácido betulônico (9,9%) e após recromatografia por gravidade os metabólitos **6** (8 mg) e **7** (27 mg).

Em experimento posterior, utilizou-se 462 mg de betulina que após a fermentação resultou em 138 mg de extrato bruto. Esse foi submetido a cromatografia em camada fina centrífuga utilizando como fase móvel diclorometano; diclorometano:acetato de etila (95:05). Através desse procedimento foi isolada a substância **8** (5 mg) e a betulina foi recuperada (38,7 mg; 8,4%).



a – cromatografia sólido-líquida a gravidade

b - cromatografia sólido-líquida a vácuo

c- cromatografia em camada delgada centrífuga (CCDC)

## ESQUEMA 8: METABÓLITOS GERADOS NA BIOTRANSFORMAÇÃO PELO *Chaetophoma* sp. FRENTE AOS SUBSTRATOS.

### Substância 4

Aspecto físico: sólido branco

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Figura 40 (pág. 86)

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 20 (pág. 72); Figura 41 (pág. 87)

### Substância 6

Aspecto físico: sólido branco

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Figura 42 (pág. 87)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 21 (pág. 73) Figura 43 (pág. 88)

### Substância 7

Aspecto físico: sólido branco

Ponto de fusão: 215-218°C

$[\alpha]^{25}$ : +12,7 (c=0,3; MeOH)

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3403; 2951; 1706; 1676 Figura 46 (pág. 89)

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Figura 47 (pág. 90)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 21 (pág. 73); Figura 48 (pág. 90)

## Substância 8

Aspecto físico: sólido branco

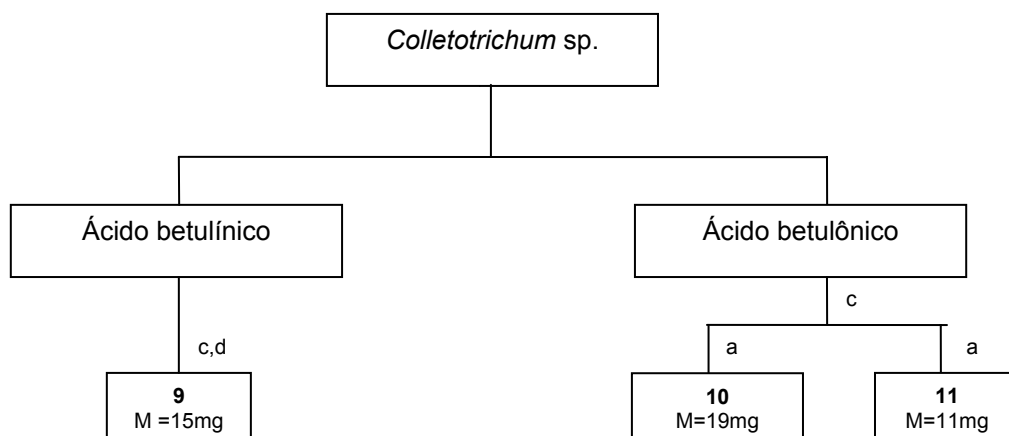
RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Figura 57 (pág. 95)

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Figura 58 (pág. 95)

- **Biotransformação por *Colletotrichum* sp.**

O experimento em escala preparativa com o ácido betulínico (640 mg) apresentou dois metabólitos. Após a fermentação o caldo foi filtrado e extraído. O resíduo foi cromatografado em CCDC utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila (8:2) e obteve-se o composto 9A (23 mg) que ao ser analisado em CCD mostrava uma única mancha, porém, quando analisado em CLAE verificou-se a existência de uma mistura (9A e 9B) cujos  $R_f$  coincidiam. Nessas condições, a separação desta mistura seria difícil pelos métodos cromatográficos tradicionais. Optou-se então pela separação dos compostos em CLAE preparativa. A fase móvel empregada foi acetonitrila (A) e água com pH ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico (B) (4:1). Coluna C18 com partículas 10  $\mu\text{m}$  a temperatura de 25 °C; volume de injeção de 500  $\mu\text{L}$  e detecção realizada em 205 nm. Infelizmente, somente um das substâncias **9A** (15 mg) foi obtida com massa suficiente para análises espectrométricas e passou a ser chamada simplesmente de **9**.

Para a fermentação com o ácido betulônico foram empregados 640 mg do substrato que resultou em 378 mg de extrato bruto. O extrato foi cromatografado por CCDC e a eluição foi realizada com hexano: acetato de etila (8:2); (6:4); (1:1). Dessa forma, foram conseguidos 98,6 mg de ácido betulônico (15,4%) e após recromatografia por gravidade as substâncias **10** (19 mg) e **11** (11 mg) (Esquema 9).



a – cromatografia sólido-líquida a gravidade

c - cromatografia em camada delgada centrífuga (CCDC)

d - cromatografia líquida de alta eficiência preparativa – CLAE

ESQUEMA 9: METABÓLITOS GERADOS NA BIOTRANSFORMAÇÃO PELO *Colletotrichum* sp. FRENTE AOS SUBSTRATOS.

#### Substância 9 e 10

Aspecto físico: sólido branco

Ponto de fusão: 274-276°C

$[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ : -11,5 (c=0,4; MeOH)

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2945; 1706; 1604; Figura 51 (pág. 92)

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Figura 52 (pág. 92)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 20 e 21 (pág. 72 e 73); Figura 53 (pág. 93)

#### Substância 11

Aspecto físico: sólido branco

Ponto de fusão: 280-282°C

$[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ : +20 (c=0,3; MeOH)

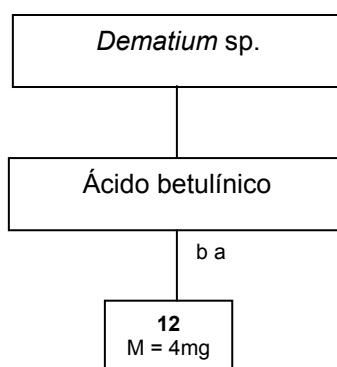
IV  $\nu_{\text{máx}}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3467; 2945; 1706; 1688 Figura 34 (pág. 83)

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Figura 35 (pág. 84)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 21 (pág. 73); Figura 36 (pág. 84)

- **Biotransformação de *Dematium* sp.**

O experimento em escala preparativa com o ácido betulínico (640 mg) e o fungo *Dematium* sp. apresentou dois metabólitos, porém só um foi conseguido em quantidade suficiente para identificação. Após a fermentação o caldo foi filtrado e extraído. O resíduo (451 mg) foi submetido a cromatografia líquida a vácuo com 45 g de sílica, partículas de 5-40 µm. A eluição foi realizada com hexano:diclorometano (8:2); diclorometano; diclorometano:acetato de etila (9:1); (8:2); (1:1) sendo coletadas frações de 50 mL as quais foram analisadas por CCD. Recuperou-se 112 mg (17,5%) do material de partida e a substância **12** (3,8 mg) que após ter sido recromatografada a gravidade foi obtida com alto grau de pureza (Esquema 10).



a – cromatografia sólido-líquida a gravidade

b - cromatografia sólido-líquida a vácuo

**ESQUEMA 10: METABÓLITOS GERADOS NA BIOTRANSFORMAÇÃO PELO *Dematium* sp. FRENTE AO SUBSTRATO.**

**Substância 12**

Aspecto físico: sólido branco

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Figura 40 (pág. 86)

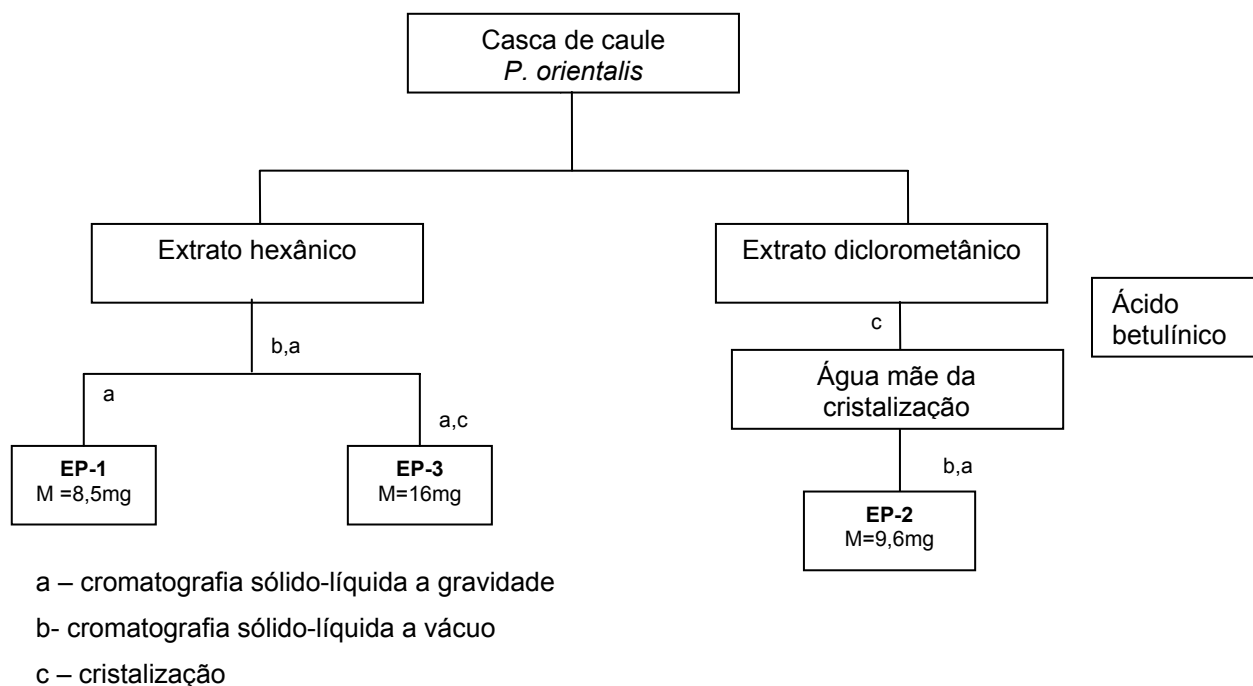
RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 20 (pág. 72); Figura 41 (pág. 87)

### 3.7 ESTUDO FITOQUÍMICO DE *P. orientalis*

A casca do caule de *P.orientalis* seca (100 g) foi moída e extraída com 250 mL de hexano em aparelho Soxhlet por 1 hora. O extrato obtido foi filtrado, o solvente destilado em rotaevaporador e denominado de fração hexânica (250 mg). A extração em Soxhlet continuou por mais três horas com 250 mL de diclorometano. Depois de seco essa fração foi denominada fração diclorometânica (Esquema 11).

A fração hexânica foi incorporada em celite e submetida a cromatografia líquida a vácuo sendo utilizado 24 g de sílica, partículas de 2-25 µm, em coluna de 3 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada com hexano; hexano-acetato de etila (7:3; gradiente 5%). Foram coletadas frações de 50 mL, as quais foram analisadas em CCD. Parte dessas foram reunidas e recromatografadas em coluna a gravidade utilizando como eluente hexano e hexano-acetato de etila (95: 5). Esse procedimento levou ao isolamento da substância **EP-1** (8,5 mg) e a mistura **EP-3** (16 mg).

Da fração diclorometânica foi obtido o ácido betulínico por cristalização em etanol. A água mãe da cristalização do ácido betulínico foi destilada em rotaevaporador (3,9 g), incorporada em celite e submetida a cromatografia líquida a vácuo utilizando 80 g de sílica, partículas de 2-25 µm, em coluna de 3 cm de diâmetro interno. A eluição foi realizada com diclorometano (7 frações); diclorometano-acetato de etila (até 1:1, gradiente 10%). Foram coletadas frações de 100 mL, as quais foram analisadas em CCD. Parte das frações foram reunidas (534 mg) e recromatografadas em coluna a gravidade. A eluição foi feita com diclorometano-acetato de etila (gradiente 10%,100% - 80:20). Frações dessas foram refracionadas em coluna usando como eluente hexano-acetato de etila (gradiente 5%; 80:20 a 50:50%). Desse experimento foi isolado a substância **EP-2** (9,6 mg).



ESQUEMA 11: FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA CASCA DO CAULE DE *P. orientalis* L.

#### Substância **EP-1**

Aspecto físico: sólido branco

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Figura 59 (pág. 96)

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Tabela 22 (pág. 74) Figura 60 (pág. 96)

#### Substância **EP-2**

Aspecto físico: sólido branco

Ponto de fusão: 295-297°C

$[\alpha]^{25}_D$ : -17,2 (c=0,1; MeOH)

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , gta pyd ): Figura 62 (pág. 97)

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , gta pyd): Tabela 22 (pág. 74); Figura 63 (pág. 98)

#### Substância **EP-3**

Aspecto físico: sólido branco

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Figura 67 (pág. 99)

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Figura 68 (pág. 99)

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS EPIFÍTICOS E ENDOFÍTICOS

Para o isolamento dos fungos epifíticos foram utilizadas 400 amostras de cascas de *P. orientalis* plaqueadas em placa de Petri em meio BDA e 400 amostras em meio SDA, conforme metodologia específica. Também foi realizado o isolamento dos fungos endofíticos com o mesmo número de amostras e nos dois meios de cultura em estudo.

Os resultados dos fungos isolados foram expressos em número de cascas infectadas por determinado fungo - incidência de fungos (f) e a frequência de aparecimento de determinado fungo em relação ao total (fr) para cada amostra avaliada. Com o propósito de se verificar se algum dos meios utilizados (BDA, SDA) poderia ser mais adequado para o isolamento e cultivo dos fungos isolados, comparou-se a frequência absoluta dos mesmos através do teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) onde se considerou a hipótese de independência. As tabelas 3 e 4 mostram os gêneros isolados com os respectivos valores de frequência absoluta, relativa,  $\chi^2$ , significância assim como a indicação do melhor meio para o isolamento (+)

TABELA 3: FREQUÊNCIA ABSOLUTA (f) E RELATIVA (fr %) DE FUNGOS EPIFÍTICOS ISOLADOS DA CASCA DE *P. orientalis* NOS MEIOS DE CULTURA BDA E SDA.

Gênero	BDA		SDA		$\chi^2$	BDA	SDA
	f	fr(%)	f	fr(%)			
<i>Mucor</i> sp.	158	39,50	136	34,00	2,600 n.s.	n.s.	n.s.
<i>Rhizopus</i> sp.	100	25,00	164	41,00	23,150**	-	+
<i>Dematium</i> sp.	57	14,25	0	0,00	61,380**	+	-
<i>Chaetophoma</i> sp.	0	0,00	32	8,00	33,350**	-	+
<i>Arthobotrys</i> sp.	0	0,00	27	6,75	27,940**	-	+
<i>Trichoderma</i> sp.	15	3,75	3	0,75	8,180**	+	-
<i>Drecheslera</i> sp.	15	3,75	3	0,75	8,180**	+	-
<i>Nigrospora</i> sp.	11	2,75	0	0,00	11,140**	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	6	1,50	2	0,50	2,020 n.s.	n.s.	n.s.
<i>Pestototia</i> sp.	2	0,50	0	0,00	2,004 n.s.	n.s.	n.s.
<i>Rhizomucor</i> sp.	0	0,00	2	0,50	2,004 n.s.	n.s.	n.s.
<i>Aspergillus</i> sp.	1	0,25	0	0,00	1,002 n.s.	n.s.	n.s.
<i>Alternaria</i> sp.	1	0,25	0	0,00	1,002 n.s.	n.s.	n.s.
Sem crescimento	34	8,50	31	7,75	0,150 n.s.	n.s.	n.s.
Total	400	100,00	400	100,00	-		

\* significância a 5%

n.s. - não significativo

\*\*significância a 1%

(+) melhor meio a ser utilizado



TABELA 4: FREQUÊNCIA ABSOLUTA (f) E RELATIVA (fr %) DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA CASCA DE *P. orientalis* NOS MEIOS DE CULTURA BDA E SDA.

Gênero	BDA		SDA		$\chi^2$	BDA	SDA
	f	fr(%)	f	fr(%)			
<i>Mucor</i> sp.	73	18,25	91	22,75	2,48 n.s.	n.s.	n.s.
<i>Stachibotrys</i> sp.	162	40,50	0	0,00	203,00**	+	-
<i>Trichophyton</i> sp.	0	0,00	87	21,75	97,61**	-	+
<i>Trichoderma</i> sp.	26	6,50	37	9,25	2,08 n.s.	n.s.	n.s.
<i>Aspergillus</i> sp.	49	12,25	52	13,00	0,10 n.s.	n.s.	n.s.
<i>Phoma</i> sp.	32	8,00	86	21,50	28,99**	-	+
<i>Aspergillus niger</i>	2	0,50	2	0,50	0,00 n.s.	n.s.	n.s.
<i>Fusarium</i> sp.	12	3,00	2	0,50	7,27**	+	-
<i>Curvularia</i> sp.	0	0,00	1	0,25	1,00 n.s.	n.s.	n.s.
Não Identificado	9	2,25	13	3,25	0,74 n.s.	n.s.	n.s.
Sem crescimento	35	8,75	29	7,25	0,61 n.s.	n.s.	n.s.
Total	400	100,00	400	100,00	-		

significância a 5%

significância a 1%

n.s.não significativo

(+) melhor meio a ser utilizado

Dos 800 fragmentos de casca de caule utilizados em cada experimento foram isolados 21 fungos epifíticos e 17 endofíticos. Após a identificação resultaram em 13 gêneros de fungos epifíticos e 8 endofíticos. Desses quatro apareceram em ambos os experimentos: *Mucor* sp.; *Trichoderma* sp.; *Aspergillus* sp.; *Fusarium* sp.

A incidência de fungos em meio BDA e SDA apresentaram diferenças, no entanto, pôde-se constatar que os fungos *Mucor* sp.; *Rhizopus* sp.; *Trichoderma* sp.; *Aspergillus* sp.; *Drescheslera* sp.; *Phoma* sp.; *Fusarium* sp.; desenvolveram-se nos dois meios sendo que *Mucor* sp. apresentou a maior incidência representando 36,75% dos fungos epifíticos e 20,50% dos endofíticos aparecendo em 28,62% do total das amostras.

Os fungos epifíticos *Trichoderma* sp., *Drescheslera* sp. e *Fusarium* sp. foram encontrados nos dois meios, porém foram mais frequentes em BDA. Os fungos *Dematium* sp., *Nigrospora* sp., *Pestotlotia* sp., *Aspergillus* sp. e *Alternaria* sp. foram encontrados somente em BDA, enquanto, *Chaetophoma* sp., *Arthobotrys* sp. e *Rhizomucor* sp. em SDA.

Os gêneros que apresentaram diferença significativa quanto à frequência observada nos diferentes meios foram: *Dematium* sp., *Trichoderma* sp., *Dreschelera* sp., *Nigrospora* sp. mais freqüentes em BDA, enquanto que *Rhizopus* sp., *Chaetophoma* sp. e *Arthobotrys* sp. o foram em SDA. Para os demais fungos o teste  $\chi^2$  mostrou que a alteração de meio não foi significativa .

Os fungos endofíticos *Mucor* sp.; *Trichoderma* sp.; *Aspergillus* sp.; *Phoma* sp.; *Aspergillus.niger*; *Fusarium* sp. foram encontrados nos dois meios sendo que os quatros primeiros foram mais freqüentes em SDA. O fungo *Stachibotrys* sp. foi encontrado somente em BDA; enquanto *Trichophyton* sp. em SDA, nesses casos, de acordo com o teste  $\chi^2$  a alteração do meio foi fundamental para o crescimento dos fungos.

Portanto, pôde-se concluir que os diferentes meios de cultivo utilizados favoreceram o crescimento de determinados fungos o que se justifica pela composição diferenciada dos mesmos.

Grande parte dos fungos isolados pertence à família Moniliaceae: *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp.; *Arthobotrys* sp.; a família Dematiaceae: *Alternaria* sp.; *Curvularia* sp.; *Dematium* sp.; *Nigrospora* sp.; *Stachibotrys* sp; a família Mucoraceae: *Mucor* sp.; *Rhizopus* sp. que são geralmente encontrados como saprófitos de solo e de madeira em decomposição, justificando assim a presença desses nessa espécie vegetal.

## 4.2 BIOTRANSFORMAÇÃO EM ESCALA ANALÍTICA – SCREENING

O screening foi realizado com os três substratos propostos: ácido betulínico (I); ácido betulônico (II) e betulina (III) conforme descrito no item 3.5. Os resultados positivos foram assinalados na tabela abaixo:

TABELA 5: ANÁLISE DO SCREENING DO ÁCIDO BETULÍNICO (I), ÁCIDO BETULÔNICO (II) E BETULINA (III).

Fungo	I	II	III	Fungo	I	II	III
<i>Alternaria</i> sp.	-	-	-	<i>Mucor</i> sp.	X	X	X
<i>Arthrotrrys</i> sp.	-	X	-	<i>Nigrospora</i> sp.	-	-	-
<i>Aspergillus nidelans</i>	-	-	-	<i>Penicillium</i> sp.	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	-
<i>Aspergillus</i> sp	-	-	-	<i>Pestalotia</i> sp.	-	-	-
<i>Chaetophoma</i> sp.	X	X	X	<i>Phoma</i> sp.	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	-	<i>Rhizomucor</i> sp.	-	-	-
<i>Colletotrichum</i> sp.	X	X	-	<i>Rhizopus</i> sp	-	-	-
<i>Curvularia</i> sp	-	-	-	<i>Stachibotrys</i> sp.	X	X	X
<i>Dematium</i> sp.	X	-	-	<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-
<i>Dreschelera</i> sp.	-	-	-	<i>Trichophyton</i> sp.	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	<i>Trichothecium</i> sp.	-	-	-
<i>Gibberella</i> sp.	-	-	-				

X = resultado positivo

- = resultado negativo

Os fungos apresentaram comportamento diferente para cada substrato. *Chaetophoma* sp.; *Mucor* sp. e *Stachibotrys* sp. foram sensíveis aos três substratos, enquanto *Arthrotrrys* sp.; *Colletotrichum* sp. e *Dematium* sp. o foram parcialmente.

De acordo com o teste  $\chi^2$  do isolamento dos fungos epi/endofítico, aqueles que tiveram o crescimento favorecido em meio SDA ou BDA foram testados também nesses meios com os três substratos. Os resultados não sofreram alteração em relação ao screening inicial.

Dos seis fungos que apresentaram metabólitos novos frente aos substratos, cinco foram isolados do *P. orientalis*, sendo que o fungo endofítico *Colletotrichum* sp. havia sido isolado do milho e foi obtido junto à coleção da Prof Ida Pimentel. Para a escala preparativa foram selecionados quatro fungos: *Arthrotrrys* sp.; *Chaetophoma* sp.; *Colletotrichum* sp. e *Dematium* sp.. O fungo *Mucor mucedo* UI-4605 foi empregado por Kouzi *et al.*, (2000) na biotransformação do ácido betulínico e haveria grande possibilidade de confirmar os resultados do seu experimento. Já o

fungo *Stachibotrys* sp. teve a sua identificação confirmada posteriormente. Por esses motivos os dois fungos foram desconsiderados nessa fase do experimento.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS.

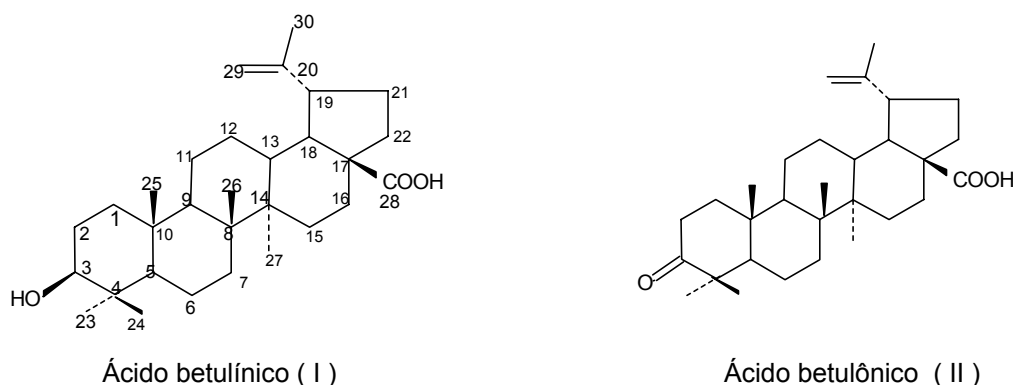


FIGURA 5: ESTRUTURA DO ÁCIDO BETULÍNICO E DO ÁCIDO BETULÔNICO

Os ácidos betulínico e betulônico, obtidos conforme metodologia apresentada no item 3.2.1 e 3.2.3, foram confirmados através de técnicas espectroscópicas no infravermelho (IV); RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (fig.17 a 23, pág. 75 a 77) e determinação das constantes físicas. Os dados obtidos foram comparados e confirmados na literatura (CÎNTĂ PÎNZARU *et al.*, 2002; CARPENTER *et al.*, 1980; PENG *et al.*, 1978)

O ácido betulínico possui a fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$  e PM:456. Encontra-se na forma de cristais brancos e possui baixa solubilidade em clorofórmio, éter de petróleo, DMF, DMSO, benzeno e solubilidade limitada em etanol e metanol, sendo solúvel em ácido acético e piridina (CICHEWICZ & KOUZI, 2004). Esse composto teve seu ponto de fusão determinado em 290-292°C e o índice de rotação  $[\alpha]_D +9,8$ ; (c:1,0, MeOH) sendo que esses dados foram confirmados na literatura (CICHEWICZ & KOUZI, 2004).

O ácido betulônico apresenta fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$  e PM:454. Possui a forma cristalina e apresenta solubilidade em clorofórmio, acetona, acetato de etila, propanol, etanol, metanol. As determinações de suas constantes físicas mostraram para o ponto de fusão 258°-260°C e índice de rotação  $[\alpha]_D +19,5$ ; (c:1,0; MeOH).

Em geral, os compostos triterpenóicos mostram no espectro no infravermelho sinais em  $3650\text{-}3590\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes a hidroxila secundária, sinais intensos

em  $2960\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$  e  $1485\text{-}1445\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo a deformações axiais de  $\text{-CH-}$  e angulares de  $\text{-CH}_2\text{-}$ . Insaturações podem ser observadas a  $3040\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$  correspondendo a deformação axial  $\text{=C-H}$  e em  $1680\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ , às deformações de  $\text{C=C}$ . Nos ácidos carboxílicos, onde o grupo  $\text{-COOH}$  está rodeado de grupos volumosos, estes se encontram na forma de monômeros e absorvem em  $1678\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$ , com sinais adicionais a  $3620\text{ cm}^{-1}$ . Se o ácido se encontra na forma de dímero a absorção localiza-se em  $1742\text{ a }1745\text{ cm}^{-1}$ . (CÎNTĂ PÎNZARU *et al.*, 2002).

Os espectros no IV dos dois compostos (fig.17 e 20, pág. 75 e 76) confirmaram estas informações, mostrando respectivamente os picos em  $2865$  e  $2938\text{ cm}^{-1}$  referentes ao estiramento  $\text{C-H sp}^3$ ;  $1675$ ;  $1681$  e  $1706\text{ cm}^{-1}$  estiramento  $\text{C=O}$ ;  $1446$  e  $1453\text{ cm}^{-1}$  deformação angular  $\text{CH}_2$ ;  $1236$  e  $879\text{ cm}^{-1}$  deformação  $\text{C-H}$ ,  $\text{C-C}$  e  $\text{C-O}$ . O que diferenciou os dois compostos foi a presença do pico em  $3446\text{ cm}^{-1}$  no ácido betulínico referente ao estiramento  $\text{OH}$  do álcool secundário ausente no ácido betulônico enquanto este apresenta dois picos referente as carbonilas de cetona e de ácido ( $1681$  e  $1706\text{ cm}^{-1}$ ).

A análise das estruturas acima permitiu observar a existência de 6 carbonos metílicos, 10 metilênicos  $\text{sp}^3$ , 5 metínicos  $\text{sp}^3$  e 6 carbonos quaternários, sendo 5  $\text{sp}^3$  inseridos no esqueleto carbônico e um carboxílico. Verificou-se ainda a ligação dupla terminal ( $\Delta 20/29$ ), além do C-3 ora  $\text{sp}^3$  ligado a heteroátomo ora  $\text{sp}^2$  carbonílico. Devido ao grande número de hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^3$ , característico aos terpenos, o RMN de  $^1\text{H}$  torna-se bastante complexo na região 0,8 a 1,6 ppm e portanto pouco elucidativo. Mesmo assim, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o ácido betulínico (fig.18) mostrou os sinais característicos para os hidrogênios de metilas como simpletos com  $\delta_{\text{H}}$ : 0,83; 1,00; 1,06; 1,07; 1,22; 1,79 (3H, s, H-25, H-24, H-26, H-27, H-23, H-30) e os hidrogênios metilênicos  $\delta_{\text{H}}$ : 4,77 (1H, s, H-29) e 4,95 (1H, s, H-29) e  $\delta_{\text{H}}$ : 3,45 para H-3. Para ácido betulônico (fig.21) os simpletos referentes aos hidrogênios das metilas em  $\delta_{\text{H}}$ : 0,93; 0,99; 1,01; 1,07; 1,26; 1,69 (3H, s, H-25, H-24, H-26, H-27, H-23, H-30); os hidrogênios metilênicos  $\delta_{\text{H}}$ : 4,62 (1H, s, H-29) e 4,74 (1H, s, H-29) e a ausência do sinal em 3,45 referente ao H-3.

Tendo em vista as características gerais das estruturas apresentadas para as duas substâncias, nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  pôde-se observar, os sinais de carbono  $\text{sp}^3$  na região de 14 a 60 ppm; os sinais característicos a  $\Delta(20/29)$  em  $\delta_{\text{C}}$ : 109,9 e 150,2 e o carbono carboxílico em  $\delta_{\text{C}}$ : 180,5 (C-28). A diferenciação das

substâncias se deu através do C-3 com  $\delta_C$ : 78,2 ppm, metínico  $sp^3$  ligado a oxigênio para o ácido betulínico, enquanto que, para o ácido betulônico o C-3 carbínico em torno de  $\delta_C$ : 215 não foi observado no espectro, mas pôde ser comprovado através da alteração dos valores de C-2 e C-4 ( $\delta_C$ :34,1 e 47,4). Os deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}C$  (fig. 19 e 22) podem ser analisados e comparados aos da literatura, conforme tabela 6:

TABELA 6: COMPARAÇÃO DOS VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICO DE RMN  $^{13}C$  DO ÁCIDO BETULÍNICO E BETULÔNICO ( $CDCl_3$ ; 100MHz)

C	Ácido Betulínico <sup>1</sup> $\delta^{13}C(ppm)$	Ácido Betulínico <sup>2</sup> $\delta^{13}C(ppm)$	Ácido Betulônico <sup>3</sup> $\delta^{13}C(ppm)$	Ácido Betulônico <sup>2</sup> $\delta^{13}C(ppm)$
1	39,3	38,9	39,6	39,7
2	28,3	28,1	34,0	34,1
3	78,1	78,2	218,1	---
4	39,5	39,0	47,3	47,4
5	55,9	55,5	54,8	55,0
6	18,8	18,1	19,5	19,7
7	34,9	34,5	33,6	33,7
8	41,1	40,8	40,6	40,7
9	50,9	50,7	49,8	49,9
10	37,5	37,3	36,8	37,0
11	21,2	21,0	21,3	21,4
12	26,1	25,7	25,4	25,5
13	38,6	38,5	38,5	38,5
14	42,9	42,6	42,5	42,5
15	30,3	29,8	29,6	29,7
16	32,9	32,4	32,0	32,1
17	56,6	56,4	56,3	56,3
18	49,8	49,7	49,1	49,3
19	47,8	47,1	46,8	46,9
20	151,3	150,8	150,2	150,3
21	31,2	30,7	30,5	30,6
22	37,6	37,3	36,8	37,0
23	28,7	28,4	26,6	26,7
24	16,3	16,1	20,9	21,0
25	16,4	16,3	15,8	15,9
26	16,4	16,3	15,9	16,0
27	14,9	14,8	14,6	14,6
28	178,8	179,5	181,8	180,5
29	109,9	109,9	109,7	109,8
30	19,5	19,5	19,3	19,4

<sup>1,3</sup> Dados de literatura, <sup>1</sup>PENG *et al.*, 1978; <sup>3</sup>CARPENTER *et al.*, 1980

<sup>2</sup> RMN  $^{13}C$  dados experimentais.

--- dado não identificado no experimento

## 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS ISOLADOS

### 4.4.1 Caracterização dos metabólitos obtidos da biotransformação do ácido betulínico

A biotransformação do ácido betulínico foi realizada por três fungos: *Chaetophoma* sp., *Colletotrichum* sp. e *Dematium* sp. Nos três casos obteve-se baixo rendimento dos derivados, dificultando o isolamento e identificação dos mesmos. A dificuldade encontrada na metabolização do substrato foi consequência da sua baixa solubilidade em água, DMF, DMSO, propanol e acetona, solventes usuais para as transformações microbianas, sendo que isso impediu que o substrato entrasse em contato com as enzimas produzidas pelo microrganismo e fosse metabolizado adequadamente.

- **Substâncias 4 e 12 - Ácido betulônico**

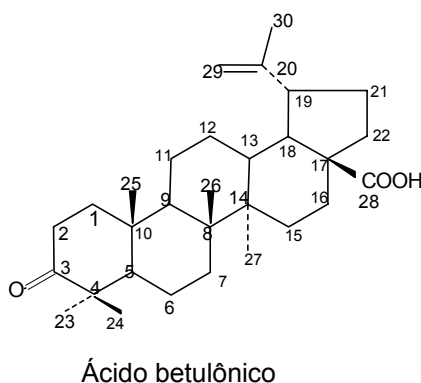


FIGURA 6: ESTRUTURA DAS SUBSTÂNCIAS **4** E **12**.

A substância **4** foi obtida da biotransformação do ácido betulínico pelo fungo *Chaetophoma* sp. enquanto que a **12** derivou da sua biotransformação pelo *Dematium* sp. Os dois fungos foram isolados da casca de *P.orientalis*.

Após cromatografia as substâncias foram analisadas em CCD e os R<sub>f</sub> encontrados foram semelhantes ao do ácido betulônico (II). Apesar do rendimento obtido de 5,8 mg para a substância **4** e 3,8 mg para a **12** as substâncias tiveram seus espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (fig. 40 e 41; pág. 86 e 87) analisados.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou o desaparecimento do sinal em  $\delta_{\text{H}}$ : 3,5 característico H-3 ligado a hidroxila e a permanência dos hidrogênios da ligação dupla terminal  $\delta_{\text{H}}$ : 4,62 (1H; s; H-29) e 4,74 (1H; s; H-29) e das 6 metilas características do esqueleto  $\delta_{\text{H}}$ : 0,93; 0,95; 0,99; 1,01; 1,07; 169 (3H; s; H-25;H-23;H-24;H-26;H-27;H-30).

Ao comparar o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido betulínico aos compostos em estudo (tabela 7), se evidencia a ausência do sinal em  $\delta_{\text{C}}$ : 78,5 referente ao C-3 hidroxilado e a alteração dos sinais de C-2 e C-4 ( $\delta_{\text{C}}$ : 34; 47,4 para o composto **4** e **12**; frente o  $\delta_{\text{C}}$ : 28,3; 39,5 para o ácido betulínico) para campo mais baixo o que indica que o C-3 foi oxidado a cetona. Comparando os dados obtidos ao da literatura pôde-se comprovar que os compostos **4** e **12** eram o ácido betulônico.

TABELA 7: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS COMPARATIVOS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS SUBSTÂNCIAS **4** E **12** E DO ÁCIDO BETULÔNICO ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})^1$	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})^2$	C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})^1$	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})^2$
1	39,6	39,7	16	32,0	32,1
2	34,0	34,1	17	56,3	56,3
3	218,1	---	18	49,1	49,3
4	47,3	47,4	19	46,8	46,9
5	54,8	55,0	20	150,2	150,3
6	19,5	19,7	21	30,5	30,6
7	33,6	33,7	22	36,8	37,0
8	40,6	40,7	23	26,6	26,7
9	49,8	49,9	24	20,9	21,0
10	36,8	37,0	25	15,8	15,9
11	21,3	21,4	26	15,9	16,0
12	25,4	25,5	27	14,6	14,6
13	38,5	38,5	28	181,8	180,5
14	42,5	42,5	29	109,7	109,8
15	29,6	29,7	30	19,3	19,4

<sup>1</sup> Dados de literatura, CARPENTERS, *et al.*, 1980

<sup>2</sup> RMN  $^{13}\text{C}$  dados experimentais.

--- dado não identificado no experimento

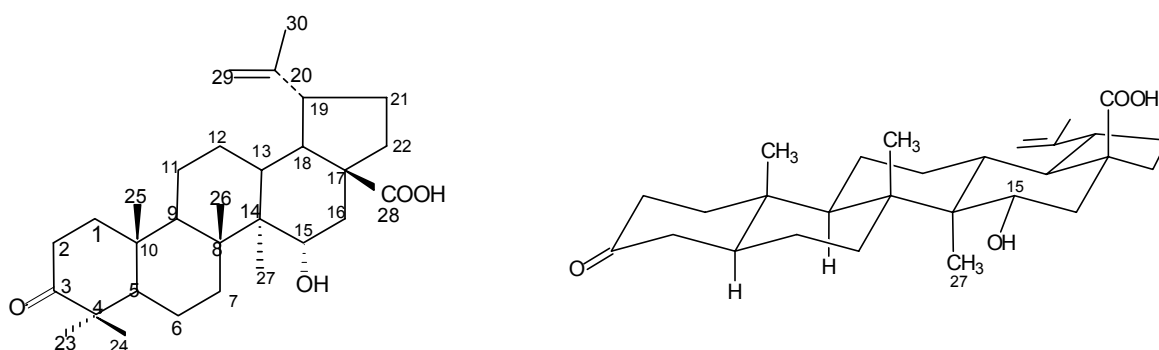


- **Substância 5**

A substância **5** foi obtida da biotransformação do ácido betulínico pelo fungo *Chaetophoma* sp.. Apresentou baixo rendimento (3mg), mesmo assim teve seus espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (fig. 69 e 70; pág. 101) analisados. Os dados fornecidos pelos seus espectros foram insuficientes para elucidar sua estrutura, visto que apresentou uma mistura do ácido betulínico e o metabólito. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  revelou os sinais característicos ao ácido betulínico, porém com a presença de dois carbonos ligados a hidroxila em  $\delta_{\text{C}}$ : 69,8 e 78,6 (C-3) mostrando que ocorreu uma oxidação no esqueleto, mas sendo impossível determinar a posição devido a quantidade obtida da mistura.

- **Substância 9 - ácido 3 oxo, 15 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-28-óico**

FIGURA 7: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA **9**



Este composto foi obtido através da biotransformação do ácido betulínico pelo fungo *Colletotrichum* sp.

O espectro no IV ( fig. 51, pág. 92) mostrou as bandas em  $3403\text{ cm}^{-1}$  referente a hidroxila;  $2945\text{ cm}^{-1}$  estiramento C-H  $\text{sp}^3$ ;  $1706$  e  $1694\text{ cm}^{-1}$  atribuídos ao estiramento C=O.

A análise dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (fig. 53 e 54; pág. 93) permitiu a construção da tabela 8. Observou-se a presença de 21 carbonos  $\text{sp}^3$  sendo 6 carbonos metínicos, um hidroxilado ( $\delta_{\text{C}}$ : 70,9; C-15), 9 metilênicos e 6 metílicos, além de um carbono metilênico  $\text{sp}^2$  em  $\delta_{\text{C}}$ : 110,1(C-29). A diferença entre o número de sinais dos espectros obtidos pelas duas técnicas indica a existência de

8 sinais correspondentes a átomos de carbono quaternário sendo 5  $sp^3$  inseridos no esqueleto carbônico e dois  $sp^2$ , um referente a ligação dupla ( $\delta_C$ : 149,8; C-20), e um referente a carboxila ( $\delta_C$ : 180,5; C-28) e a ausência do sinal referente a carbonila (C-3).

TABELA 8: ATRIBUIÇÕES DOS SINAIS POR RMN de  $^{13}C$  DA SUBSTÂNCIA **9**

C	CH	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
37,18	37,97	19,83	8,25
42,32	46,50	21,54	16,04
47,25	48,92	25,54	16,28
47,41	50,44	31,03	19,43
55,17	54,62	34,15	20,99
149,8	70,9	36,86	26,64
180,5		37,07	
		39,90	
		42,30	
		110,1	
COO+C <sub>6</sub>	(CH) <sub>6</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub>

O espectro RMN de  $^1H$  (fig. 52, pág. 92) revelou os sinais dos grupos metilas como simpletos em  $\delta_H$ : 0,94 ; 1,01; 1,01 ; 1,08; 1,26 e 1,70 (3H; s; H-25; H-24; H-26; H-27; H-23; H-30); em  $\delta_H$ : 4,74 e 4,64 (1H; s; H-29) e em  $\delta_H$ : 4,05 (1H; dd; J= 4,8Hz e 11,2Hz) referente ao H-15.

Os espectros COSY e HMQC (fig. 55 e 56; pág. 94) permitiram identificar a conectividade entre H15-H16 ( $\delta_H$ : 4,05;  $\delta_H$ : 2,46); C15-H15 ( $\delta_C$ : 70,9;  $\delta_H$ : 4,05) e C16-H16 ( $\delta_C$ : 42,30;  $\delta_H$ : 2,46).

É importante ressaltar o desaparecimento dos sinais característicos para o ácido betulínico em  $\delta_C$ : 78,14 (C-3) e  $\delta_H$ : 3,75 (1H; t; H-3; J=7,2). Surgiu, então, a hipótese da oxidação da hidroxila no C-3, comprovada pelas alterações dos sinais de C-2 em  $\delta_C$ : 34,16 e de C-4 em  $\delta_C$ : 47,4. Entretanto o sinal característico na faixa de  $\delta_C$ : 215,0 de cetona não apareceu no espectro.

Pôde-se comprovar a hidroxilação do C-15 através da comparação com o ácido betulínico (tab.20; pág. 72) dos sinais dos C-14, C-16 e C-27. Os C-14 e 16 ( $\delta_C$ : 47,4; 42,3) tiveram seus valores alterados para campo mais baixo devido a desproteção causada pela proximidade com a hidroxila. Enquanto a metila C-27 ( $\delta_C$ : 8,25) encontra-se protegida devido ao efeito  $\gamma$  da hidroxila sustentada pelo C-15.

A estereoquímica da hidroxila sustentada pelo C-15 pôde ser definida pelas constantes de acoplamento do H-15 ( $\delta_H$ :4,05; 1H; dd; J=4,8Hz e 11,2Hz), que indicam a posição axial para o H-15, definindo a posição equatorial e  $\alpha$  para a hidroxila.

As atribuições dos sinais de carbono e hidrogênio estão mostradas na tabela 9, a seguir.

TABELA 9: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  E DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA **9** - ácido 3 oxo, 15 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-28-óico ( $\text{CDCl}_3$ , 400 e 100MHz).

C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$	C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$
1	39,9	1,40 (m)	16	42,3	2,46
2	34,2	2,46 (m)	17	55,2	-
3	---	-	18	48,9	1,60 (t, J=11,5)
4	47,4	-	19	46,5	2,90 (td)
5	54,6	1,35	20	149,8	-
6	19,8	1,25 (m)	21	31,0	2,09 (m)
7	36,9	1,89;1,94	22	37,1	1,89 (m)
8	42,3	-	23	26,6	1,26 (s)
9	50,4	1,30 (m)	24	21,0	1,01 (s)
10	37,2	-	25	16,0	0,94 (s)
11	21,5	1,31	26	16,3	1,01 (s)
12	25,5	1,16 (m)	27	8,2	1,08 (s)
13	38,0	2,12	28	180,5	-
14	47,2	-	29	110,1	4,64 (s);4,74 (s)
15	70,9	4,05 (dd, J=4,8; 11,2)	30	19,5	1,70 (s)

--- dado não identificado no experimento

De posse destas informações propõe-se que a substância **9** isolada seja o ácido 3-oxo, 15 $\alpha$ -hidroxil- esquematizado acima. As constates físicas determinadas foram: ponto de fusão 274-276°C, índice de rotação -11,5 ( $c = 0,4$ ; MeOH) . Esse composto ainda não foi descrito na literatura.

#### 4.4.2 Caracterização dos metabólitos obtidos da biotransformação do ácido betulônico

- **Substância 1 - Ácido 3-oxo, 7 $\beta$ -hidroxi –lup-20(29)-en-28-óico.**

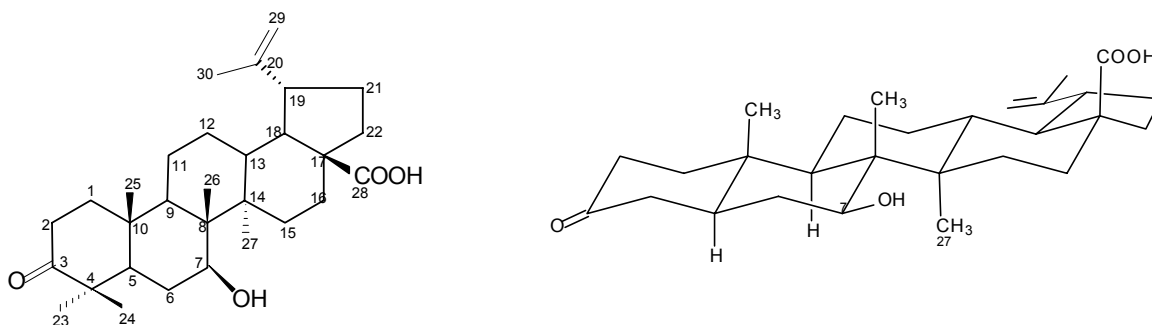


FIGURA 8: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 1

O composto **1** foi obtido através da biotransformação do ácido betulônico pelo fungo epifítico *Arthobotrys* sp. isolado da casca do *P.orientalis*.

A determinação da estrutura do metabólito 1 foi estabelecida com auxílio das técnicas espectroscópicas no IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ; e de suas constantes físicas ponto de fusão (165-168°C), índice de rotação  $[\alpha]_D$ : +17 (c= 0,6; MeOH).

O espectro no IV (fig. 24, pág. 78) apresentou conformidade com os de triterpenos, em especial mostrou as bandas em 2956-3438 $\text{cm}^{-1}$  referente a hidroxila e a 1694  $\text{cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento C=O.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e COSY ( fig. 25 e 28, pág. 79 e 80) mostrou os sinais das metilas como simpletos em  $\delta_{\text{H}}$ : 0,92; 1,00; 1,02; 1,07; 1,28; 1,69 (3H; s; H-25; H-24; H-26; H-27; H-23 H-30); os hidrogênios do metileno terminal caracterizados pelos simpletos em  $\delta_{\text{H}}$ : 4,77 e 4,61 (1H; s; H-29); duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$ : 3,84 (1H; dd; J=5,2Hz e 15,2Hz) referente ao H-7 sendo que este deslocamento indicou a proximidade a um heteroatomo; em  $\delta_{\text{H}}$ : 1,6 (2H; m; H-6) e  $\delta_{\text{H}}$ : 2,88-3,01 (1H; m; H-19).

A análise dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (fig.26 e 27, pág. 79 e 80) permitiu a construção da tabela abaixo onde observou-se a presença de 21 sinais de C  $\text{sp}^3$  ligados a hidrogênio sendo 6 metílicos, 9 metilênicos e 6 metínicos, sendo um

metínico ligado a hidroxila  $\delta_C$ : 74,4, além de um metilênico  $sp^2$ . A diferença entre os números de sinais entre as duas técnicas indica a existência de 7 carbonos quaternários sendo 5  $sp^3$  inseridos no esqueleto carbônico, um referente a carboxila  $\delta_C$ : 181,5 (C-28) e um referente a ligação dupla C-20/29  $\delta_C$ : 150,4-109,7(metilênico) conforme mostrou a tabela 10.

TABELA 10: ATRIBUIÇÕES DOS SINAIS DE ÁTOMOS DE CARBONO DA SUBSTÂNCIA - 1

C	CH	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
36,9	38,7	21,4	9,9
43,8	47,0	25,5	14,8
46,6	48,9	29,7	15,6
47,4	49,8	30,4	19,4
56,1	52,4	32,5	21,0
150,4	74,4	33,4	26,6
181,5		34,1	
		36,9	
		39,3	
		109,7	
COO+C <sub>6</sub>	(CH) <sub>6</sub> O	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub>

O sinal do carbono em  $\delta_C$ : 74,4 ppm mostrou que ocorreu uma hidroxilação no composto. A posição da hidroxila pôde ser definida em C-7 pela alteração verificada nos valores referente aos C-6, C-8, C-26 em  $\delta_C$ : 32,5; 48,9; 9,9 respectivamente, quando comparados ao ácido betulônico ( $\delta_C$ : 19,7; 40,7; 16,0, tab. 21, pág 73). Os sinais dos C-6 e C-8 encontram-se em campo mais baixo devido a proximidade ao heteroátomo, enquanto a metila C-26 encontra-se em campo mais alto devido ao efeito  $\gamma$  do grupo hidroxila sustentado pelo C-7.

A estereoquímica do C-7 foi definida através do sinal observado no RMN  $^1H$  duplo dubleto em  $\delta_H$ : 3,84 J=5,2Hz e 15,2Hz onde as constantes de acoplamento indicam a posição axial para o H-7 em relação aos H-6, definindo a posição equatorial e  $\beta$  para a hidroxila.

Verificou-se a ausência de um sinal de carbono, referente ao grupo carbonílico em torno de  $\delta_C$ : 215, entretanto sua presença pôde-se ser confirmada ao comparar os sinais do C-2 em  $\delta_C$ : 34,0 e C-4 em  $\delta_C$ : 46,6 com os obtidos no RMN de  $^{13}C$  para o ácido betulônico (tab. 21, pág.73).

A tabela 11 definiu a estrutura mostrada acima como sendo o ácido 3-oxo, 7 $\beta$ -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico, composto inédito .

TABELA 11: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA 1 - Ácido 3-oxo, 7 $\beta$ -hidroxi -lup-20(29)-en-28-óico ( $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz)

C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$
1	39,3	16	33,4
2	34,0	17	56,0
3	----	18	48,9
4	46,6	19	47,0
5	52,4	20	150,4
6	32,5	21	30,4
7	74,4	22	36,9
8	48,9	23	26,4
9	49,8	24	21,0
10	36,9	25	15,6
11	21,4	26	9,9
12	25,5	27	14,7
13	38,7	28	181,5
14	43,8	29	109,7
15	29,7	30	19,4

--- dado não identificado no experimento

- **Substâncias 3 e 11 - Ácido 3-oxo, 7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diidroxi -lup-20(29)-en-28-óico.**

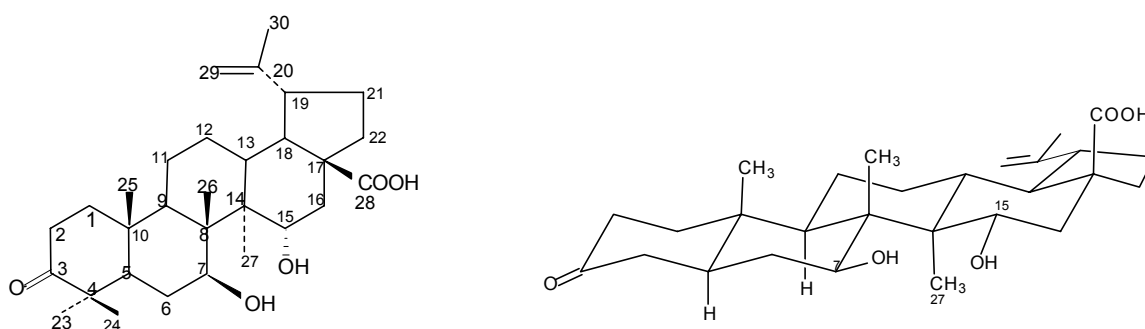


FIGURA 9: ESTRUTURA DAS SUBSTÂNCIAS 3 E 11

A substância **3** foi obtida através da biotransformação do ácido betulônico pelo fungo epifítico *Arthobotrys* sp. isolado da casca do *P. orientalis* L., enquanto a substância **11** foi obtida da biotransformação do mesmo substrato pelo fungo endofítico *Colletotrichum* sp.

Os dados espectroscópicos no IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (fig. 34-39, pág. 83-86) das substâncias **3** e **11** apresentaram semelhança com a substância **1**, porém o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostrou o aparecimento de dois carbonos metínicos ligados a hidroxila em  $\delta$ : 68,9; 72,8 (C-15, C-7) em substituição a  $\text{CH}_2$ . Pelo mapa de contorno HMQC pôde-se relacionar os sinais anteriormente descritos aos duplos dupletos em  $\delta$ : 3,9 (1H; dd;  $J=6,8$ ; 15,6; H-15); 3,8 (1H; dd;  $J=6,4$ ; 15,6; H-7).

Ao comparar os dados do ácido betulônico a esse novo composto (tab.21, pág. 73), foi possível definir as posições das hidroxilas em C-7 e C-15, baseando-se nos deslocamentos para campo mais baixo dos C-6, C-8, C-14, C-16 devido ao efeito indutivo retirador de elétrons da hidroxila próxima a eles, em  $\delta_{\text{C}}$ : 41,5; 47,9; 48,6; 31,0 respectivamente. Enquanto as metilas C-26 e C-27 apresentaram os  $\delta_{\text{C}}$ : 10,7; 8,3 sobre cone de proteção da carbonila.

A estereoquímica do H-7 e H-15 foram definidos através do sinal observado no RMN  $^1\text{H}$  e HMQC. O duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$ : 3,8 ( $J=6,4$  e 15,6; H-7) pelo HMQC mostrou conectividade com  $\delta_{\text{C}}$ : 72,8 (C-7) sendo que as constantes de acoplamento indicaram a posição axial para o H-7 em relação aos H-6, definindo a posição equatorial e  $\beta$  para a hidroxila. O duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$ : 3,9 ( $J=6,8$  e 15,6, H-15) pelo HMQC mostrou conectividade com  $\delta_{\text{C}}$ : 68,9 (C-15) sendo que as constantes de acoplamento indicaram a posição axial para o H-15, definindo a posição equatorial e  $\alpha$  para a hidroxila.

O espectro no IV (fig.34, pág. 83) confirmou a presença das carbonilas através da absorção em  $1706\text{ cm}^{-1}$ , das hidroxilas em  $3467\text{ cm}^{-1}$  e o estiramento C-H  $\text{sp}^3$  característico em  $2945\text{ cm}^{-1}$ .

A tabela 12 mostra as atribuições dos sinais de átomos de carbono e hidrogênio para o composto **3** e **11** definido como ácido 3-oxo,  $7\beta,15\alpha$ -diidroxilup20(29)-en-28-óico, conforme estrutura acima. O ponto de fusão determinado para este composto foi de  $280\text{-}282^\circ\text{C}$  e o índice de rotação  $+20$  ( $c=0,3$ ; MeOH).

Este composto já havia sido descrito por Akihisa *et al.* (2002) como metabólito da biotransformação do ácido betulônico pelo fungo *Chetomium longirostre*, porém houve divergência nos deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio encontrados o que pode ser explicado pelas diferenças das condições experimentais.

TABELA 12: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  DAS SUBSTÂNCIAS **3** e **11** - Ácido 3-oxo, 7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diidroxi -lup-20(29)-en-28-óico ( $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz).

C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$	C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$
1	39,5	1,35 (m)	16	41,5	1,25 (m)
2	34,1	2,46 (m)	17	54,6	-
3	---	-	18	49,7	1,27
4	46,9	-	19	46,5	2,95 (td)
5	52,1	1,35 (m)	20	149,9	-
6	31,0	2,55 (m)	21	29,7	2,05 (m)
7	72,8	3,80 (dd, J=6,4;15,6)	22	36,8	2,00 (m)
8	47,9	-	23	26,4	1,10 (s)
9	48,7	1,55 (m)	24	21,1	1,04 (s)
10	37,0	-	25	15,5	0,93 (s)
11	21,1	1,4-1,6	26	10,7	1,03 (s)
12	25,1	1,15 (m)	27	8,3	1,02 (s)
13	37,2	2,20 (m)	28	180,2	-
14	48,6	-	29	110,0	4,63 (s);4,72 (s)
15	68,9	3,90 (dd, J=6,8;15,6)	30	19,5	1,69 (s)

--- dado não identificado no experimento

• **Substância 2 - Ácido 3-oxo, 7 $\beta$ , 30 diidroxi-lup-20(29)-en-28-óico.**

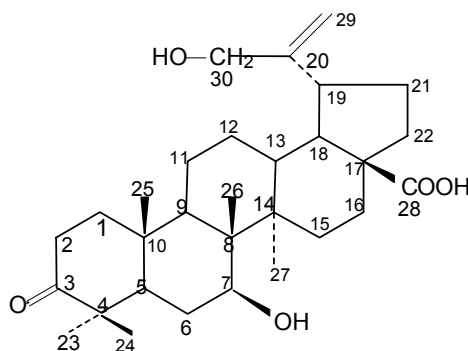


FIGURA 10: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA **2**

O composto **2** foi obtido através da biotransformação do ácido betulônico pelo fungo epifítico *Arthrobotrys* sp. isolado da casca do *P. orientalis*.

A identificação estrutural do composto **2** foi feita com base na análise dos espectros no IV, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e COSY (fig. 29 - 33, pág. 81- 83).



Os dados no IV (fig. 29, pág. 81) estavam de acordo com o esperado para triterpenos salientando a presença da carbonila em  $1694\text{ cm}^{-1}$  e na faixa de  $3500\text{ cm}^{-1}$  a hidroxila.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e COSY mostraram os sinais  $\delta_{\text{H}}$ : 4,98 e 4,92 (1H; s; H-29) característico do grupamento isopropenil em conectividade com o sinal em  $\delta_{\text{H}}$ : 4,13 (2H; m; H-30) destacando que este deslocamento químico indica proximidade a um carbono ligado a hidroxila. Apresentou, também, o sinal em  $\delta_{\text{H}}$ : 3,85 (1H, dd,  $J=4,8$ ; 15,6; H-7) ligado ao carbono hidroxilado em  $\delta_{\text{C}}$ : 74,4 (C-7); 5 simpletos referente as metilas em  $\delta_{\text{H}}$ : 0,92; 0,99; 1,02; 1,08; 1,27 (3H; s; H-25, H-24, H-26, H-27, H-23). Observou-se a ausência da metila em  $\delta_{\text{H}}$ : 1,7 referente ao H-30 indicando que houve uma hidroxilação nesta posição.

Confrontando as informações do RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT verificou-se a existência de 5 carbonos metílicos, 11 metilênicos sendo um ligado a hidroxila  $\delta_{\text{C}}$ : 65,3 (C-30) e um  $\text{sp}^2$   $\delta_{\text{C}}$ : 107,1 (C-29), 6 metínicos sendo um oxigenado  $\delta_{\text{C}}$ : 74,4 (C-7), 7 sinais correspondente a átomos de carbono quaternário sendo um carboxílico  $\text{sp}^2$   $\delta_{\text{C}}$ : 180 (C-28) e um olefínico  $\delta_{\text{C}}$ : 154,7 (C-20) e 5  $\text{sp}^3$  inseridos no esqueleto carbônico. É importante ressaltar que o carbono olefínico teve o sinal alterado para campo mais baixo o que indica a desproteção devido a proximidade com um grupo eletronegativo.

A comparação do esqueleto do ácido betulônico com o composto em estudo (tab.21, pág.73), evidência a hidroxilação de uma metila e de um grupo metilênico. Na tabela 13, atribuem-se os sinais aos átomos de carbono. Estas análises e interpretações permitiram a elucidação do composto como o ácido 3-oxo,  $7\beta$ , 30 diidroxil-lup-20(29)-en-28-óico, cujo ponto de fusão foi de  $168\text{--}171^\circ\text{C}$ . Esse composto ainda não havia sido descrito na literatura.

TABELA 13: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA **2** - Ácido 3-oxo, 7 $\beta$ , 30 diidroxi-lup-20(29)-en-28-óico ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz).

C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$
1	39,3	16	32,3
2	34,0	17	55,9
3	---	18	49,7
4	46,9	19	42,7
5	52,4	20	154,7
6	33,4	21	30,5
7	74,4	22	36,8
8	46,6	23	26,4
9	49,8	24	21,0
10	36,9	25	15,6
11	21,5	26	9,9
12	26,9	27	14,7
13	38,7	28	180,1
14	43,8	29	107,0
15	29,7	30	65,3

--- dado não identificado no experimento

- **Substância 6 - ácido 3-oxo,12  $\beta$  hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico**

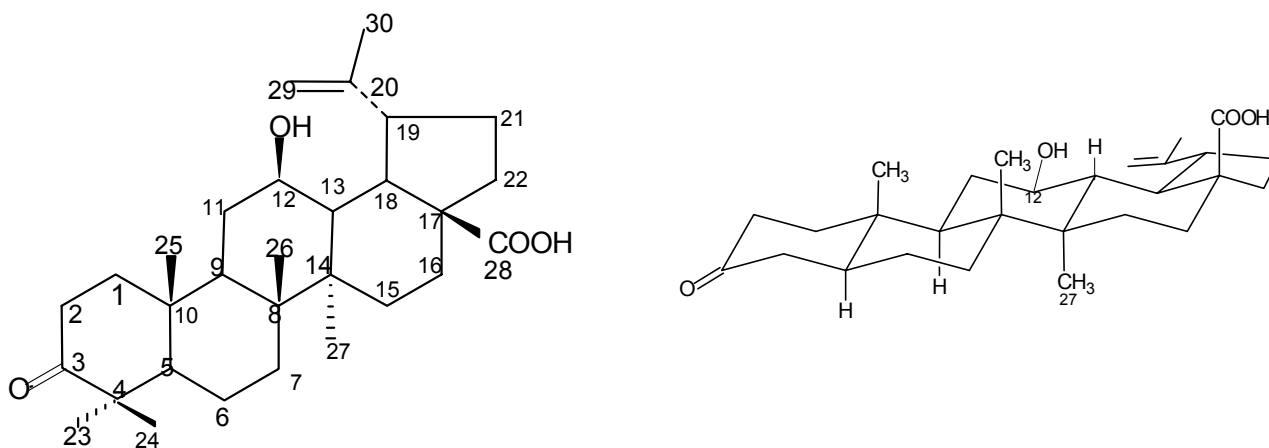


FIGURA 11: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA **6**

Este composto foi obtido através da biotransformação do ácido betulônico pelo fungo epifítico *Chaetophoma* sp. isolado da casca do *P. orientalis*.

O composto **6**, resultante da biotransformação do ácido betulônico, foi purificado por coluna cromatográfica e ainda assim resultou numa mistura do

composto de origem e seu metabólito. Mesmo assim, a determinação de sua estrutura foi estabelecida com auxílio das técnicas espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMQC.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( fig. 42, pág. 87) mostrou os sinais das metilas como simpletos em  $\delta_{\text{H}}$ : 0,91; 0,95; 1,01; 1,07; 1,25; 1,69 (3H; s; H-25, H-24, H-26, H-27, H-23, H-30) os hidrogênios do metileno terminal caracterizados em  $\delta_{\text{H}}$ : 4,74 e 4,63 (1H; s; H-29);  $\delta_{\text{H}}$ : 3,2(1H; td;  $J=4,4$ ; 11,2; 17,6; H-12);  $\delta_{\text{H}}$ : 3,0 (1H; m; H-19).

A análise dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (fig. 43, 44; pág. 88) permitiu diferenciar os sinais referentes ao ácido betulônico e ao composto **6**. Pôde-se observar que os sinais metínicos tiveram grande alteração devido a influência da hidroxilação ( $\delta_{\text{C}}$ : 72,9; C-12) resultante da biotransformação. Entretanto, observamos também que não houve mudança significativa dos sinais da metilas e dos carbonos quaternários inseridos no anel e a permanência do carbono quaternário referente a carboxila  $\delta_{\text{C}}$ : 181,5 e ao alqueno terminal  $\delta_{\text{C}}$ : 150,4/109,7(metilênico).

O HMQC mostrou a conectividade existente entre  $\delta_{\text{C}}$ : 72,9 e  $\delta_{\text{H}}$ : 3,2 (C-12 e H-12) ;  $\delta_{\text{C}}$ : 49,2 e  $\delta_{\text{H}}$ : 2,18 (C-9 e H-9).

A estereoquímica do C-12 foi definida através do sinal observado no RMN  $^1\text{H}$  triplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$ : 3,2 ( $J = 4,4$ ; 11,2 e 17,6) onde as constantes de acoplamento indicam a posição axial para o H-12 em relação aos H-11 e H-13, definindo a posição equatorial e  $\beta$  para a hidroxila.

Tendo em vista essas considerações, propõem-se como estrutura para o composto **6** o ácido 3-oxo,12  $\beta$  hidroxilup-20(29)-en-28-óico, inédito como produto de biotransformação, cujos deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  podem ser observados na tabela 14.

TABELA 14: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA **6** - ácido 3-oxo,12 $\beta$  hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico ( $\text{CDCl}_3$ ; 100 e 400MHz)

C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$	C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$
1	39,6	1,45 (m)	16	31,4	2,35 (m)
2	34,0	2,46 (m)	17	56,2	-
3	---	-	18	37,6	-
4	47,3	-	19	49,7	1,45 (m)
5	54,8	1,38 (m)	20	149,9	-
6	19,7	1,50 (m)	21	28,2	2,10 (m)
7	33,7	1,40 (m)	22	36,7	2,00 (m)
8	40,6	-	23	26,8	1,27 (s)
9	49,2	2,18 (m)	24	21,0	1,07 (s)
10	36,9	-	25	15,8	0,91 (s)
11	27,2	1,40-1,60	26	15,9	1,07 (s)
12	72,6	3,2 (td, J=4,4;17;26)	27	14,7	0,95 (s)
13	51,2	3,00 (m)	28	180,9	-
14	42,3	-	29	109,9	4,63 (s); 4,74 (s)
15	29,7	1,50 (m)	30	19,3	1,69 (s)

--- dado não identificado no experimento

- **Substância 7 - ácido 3-oxo, 25 hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico.**

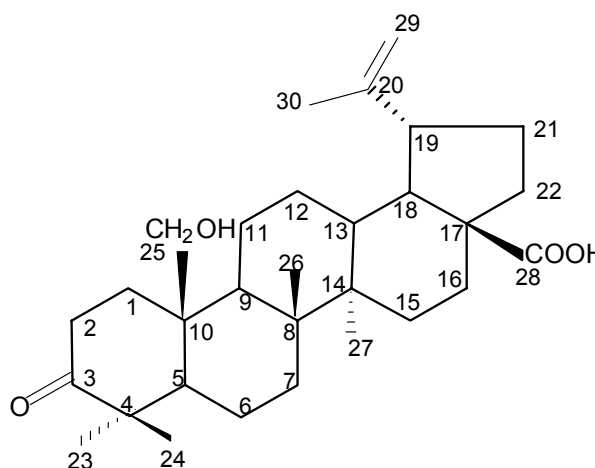


FIGURA 12: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 7.

Esta substância foi obtida através da biotransformação do ácido betulônico pelo fungo epifítico *Chaetophoma* sp. isolado da casca do *P. orientalis*.

A identificação estrutural da substância **7** foi feita com base na análise de seus espectros no IV, RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e COSY (fig. 46-50, pág. 89-91).

O espectro no infravermelho mostrou as bandas relacionadas a carbonila ( $1700$  e  $1688\text{ cm}^{-1}$ ); a hidroxila ( $3411\text{ cm}^{-1}$ ) além da absorção em  $2954\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento C-H  $\text{sp}^3$ . Essas absorções indicaram a presença das funções ácido, cetona e álcool na substância.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e COSY mostraram os sinais em  $\delta_{\text{H}}$ : 4,76 e 4,61 (1H; s; H-29) característicos da ligação dupla terminal em conectividade com o sinal em  $\delta_{\text{H}}$ : 1,70 (3H; s; H-30). Apresentou, também, o sinal de 5 simpletos referente as metilas em  $\delta_{\text{H}}$ : 1,00; 1,01; 1,23; 1,28; 1,70 (H-24, H-27, H-26, H-23, H-30).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT mostrou a presença de 5 carbonos metílicos, 11 metilênicos  $\text{sp}^3$  sendo um ligado a hidroxila em  $\delta_{\text{C}}$ : 60,4(C-25), 5 metínicos e 5 sinais correspondente a átomos de carbono quaternário  $\text{sp}^3$  inseridos no esqueleto carbônico, além de um carboxílico  $\delta_{\text{C}}$ : 179,12 e da  $\Delta\delta_{\text{C}}$ : 150,9/109,5.

Ao se comparar os sinais atribuídos aos C do composto em questão com os deslocamentos químicos do ácido betulônico (tab.21, pág. 73), evidenciou-se a hidroxilação de uma metila através do desaparecimento do seu sinal em  $\delta_{\text{C}}$ : 15,8 e o surgimento de um grupo metilênico em  $\delta_{\text{C}}$ : 60,4(C-25), além da alteração dos deslocamento dos C-1, C-5 e C-9 ( $\delta_{\text{C}}$ : 29,9; 51,4; 42,1; sendo que para o ácido betulônico  $\delta_{\text{C}}$ : 39,7; 55,0; 49,9) justificados pelo efeito  $\gamma$  do átomo de oxigênio do grupo hidroxila sustentado pelo carbono C-25.

A atribuição dos sinais aos átomos de carbono pode ser observada na tabela 15. Esse estudo permitiu a elucidação do composto como o ácido 3-oxo, 25 hidroxilup-20(29)-en-28-óico cujo ponto de fusão determinado foi  $215\text{-}218^\circ\text{C}$ . Esse composto ainda não foi descrito na literatura.

TABELA 15: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA **7** - ácido 3-oxo, 25 hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico ( $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz)

4.4.2.	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$
1	29,9	16	32,5
2	34,2	17	56,4
3	---	18	49,3
4	47,0	19	47,0
5	51,4	20	150,9
6	20,8	21	30,7
7	33,7	22	37,3
8	40,5	23	27,3
9	42,1	24	20,4
10	41,4	25	60,4
11	22,7	26	16,2
12	25,8	27	14,6
13	38,4	28	179,0
14	42,9	29	109,5
15	29,4	30	19,4

--- dado não identificado no experimento

• **Substância 10 - ácido 3 oxo, 15 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-28-óico**

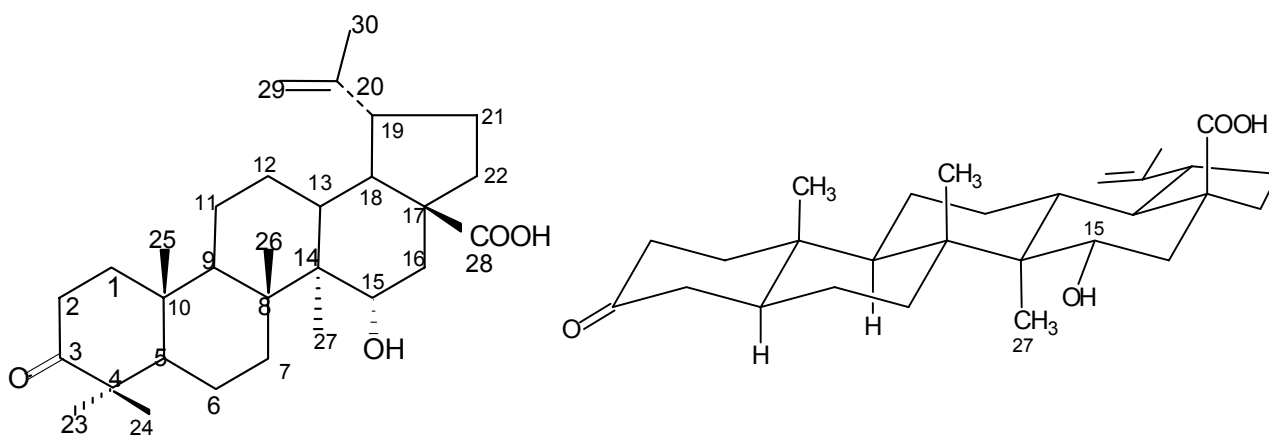


FIGURA 13: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA **10**

Esta substância foi obtida através da biotransformação do ácido betulônico pelo fungo *Colletotrichum* sp.

A identificação estrutural da substância **10** foi feita com base na análise de seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMQC, IV (fig. 51-56; pág. 92-94).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  mostraram a permanência do grupo isopropenil com os sinais característicos  $\delta_{\text{H}}$ : 4,74 e 4,64 (1H; s; H-29); 1,70 (3H; s; H-30) relacionados aos sinais de carbono  $\delta_{\text{C}}$ : 149,8(C-20); 110,1(C-29); 19,5(C-30); as cinco metilas presentes no esqueleto carbônico  $\delta_{\text{H}}$ : 0,93; 1,01; 1,06; 1,08; 1,24 (3H; s; H-25, H-24, H-26, H-27, H-23);  $\delta_{\text{C}}$ : 8,2; 16,0; 16,3; 21,0; 26,6 (C-27, C-25, C-26, C-24, C-23 respectivamente). Através do RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT verificou-se a presença dos 6 carbonos metínicos, dos 5 carbonos quaternários inseridos no esqueleto carbônico e da carboxila, característico ao ácido betulônico.

Pôde-se observar através do COSY e HMQC a conectividade entre  $\delta_{\text{C}}$ : 70,9 (C-15) e  $\delta_{\text{H}}$ : 4,07 (1H; dd;  $J=4,8$  Hz e 8Hz; H-15) caracterizando a hidroxilação de um  $\text{CH}_2$  do anel lupano. A comparação dos valores atribuídos aos carbonos para este composto ao do ácido betulônico determinou a posição 15 para a hidroxilação. As constantes de acoplamento acima são características do H-15 em posição axial o que define a posição equatorial,  $\alpha$  para a hidroxila sustentada pelo C-15.

As constantes físicas determinadas para este composto foram o ponto de fusão 274-276°C e o índice de rotação -11,5 ( $c=0,4$ ; MeOH)

Este estudo permitiu concluir que a substância **10** isolada na biotransformação do ácido betulônico foi a mesma que a substância **9** resultado da biotransformação do ácido betulínico, porém no último caso a substância foi oxidada nas posições C-3 e C-15 enquanto na **10** só foi na posição C-15, conforme dados apresentados na tabela 16. Também não havia sido relatado na literatura como derivado da biotransformação do ácido betulônico.

TABELA 16: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS COMPARATIVOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  E DE  $^{13}\text{C}$  DAS SUBSTÂNCIAS **9** E **10** - ácido 3 oxo, 15 $\alpha$ -hidroxilup-20(29)-en-28-óico ( $\text{CDCl}_3$ , 100 e 400MHz).

C	<b>9</b>		<b>10</b>	
	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$
1	39,9	1,40 (m)	39,9	1,40 (m)
2	34,2	2,46 (m)	34,2	2,45 (m)
3	---	-	---	-
4	47,4	-	47,3	-
5	54,6	1,35	54,6	1,35
6	19,8	1,25 (m)	19,8	1,25 (m)
7	36,9	1,89;1,94	37,0	1,89
8	42,3	-	42,3	-
9	50,4	1,30 (m)	50,4	1,30 (m)
10	37,2	-	37,2	-
11	21,5	1,31	21,5	1,33
12	25,5	1,16 (m)	25,5	1,16 (m)
13	38,0	2,12	38,0	2,12
14	47,2	-	47,4	-
15	70,9	4,07 (dd, J=4 e 8)	70,9	4,09 (dd, J=4 e 8)
16	42,3	2,46	42,3	2,50
17	55,2	-	55,2	-
18	48,9	1,60 (t, J=11,5)	48,9	1,60 (t)
19	46,5	2,90 (td)	46,5	3,00 (td)
20	149,8	-	149,8	-
21	31,0	2,09 (m)	31,0	2,09 (m)
22	37,1	1,89 (m)	36,9	1,87 (m)
23	26,6	1,26 (s)	26,6	1,24 (s)
24	21,0	1,01 (s)	21,0	1,01 (s)
25	16,0	0,94 (s)	16,0	0,93 (s)
26	16,3	1,01 (s)	16,3	1,06 (s)
27	8,2	1,08 (s)	8,2	1,08 (s)
28	180,5	-	180,5	-
29	110,1	4,64 (s); 4,74 (s)	110,1	4,64 (s); 4,74 (s)
30	19,5	1,70 (s)	19,5	1,70 (s)

--- dado não identificado no experimento



#### 4.4.3 Caracterização do metabólito obtido da biotransformação da betulina

- **Substância 8 – 3-oxo lup-20(29)-en-28-ol**

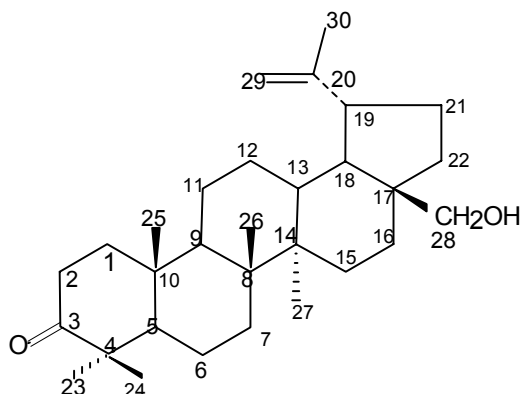


FIGURA 14: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 8.

A biotransformação da betulina com o fungo *Chaetophoma* sp. não teve o rendimento esperado. O experimento em escala analítica indicava o aparecimento de dois metabólitos após a biotransformação. Realizado o experimento em escala preparativa e após purificação obteve-se somente uma substância (5 mg).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (fig. 57, pág 95) mostrou os sinais das metilas em  $\delta_{\text{H}}$ : 0,92; 1,02; 1,05; 1,06; 1,25; 1,67 (3H, s, H-25, H-24, H-26, H-27, H-23, H-30) e os hidrogênios do metileno terminal caracterizados em  $\delta_{\text{H}}$ : 4,58 e 4,67 (1H, s, H-29).

A análise dos deslocamentos de RMN de  $^{13}\text{C}$  (fig. 58; pág. 95) permitiu observar o desaparecimento do sinal em  $\delta_{\text{C}}$ : 78,9 referente ao carbono ligado a hidroxila em C-3, verificou-se a oxidação do álcool nessa posição através dos valores de C-2 e C-4 inicialmente em  $\delta_{\text{C}}$ : 27,2 e 38,9 para  $\delta_{\text{C}}$  34,0 e 47,3. Portanto, pôde-se observar que os sinais dos anéis A e B estão próximos ao esperados para o ácido betulônico enquanto os sinais dos anéis D e E foram similares a betulina. Dessa forma propôs-se que a substância 8 é o 3-oxo lup-20(29)-en-28-ol sendo que essa substância não havia sido descrita na literatura. A tabela 17 compara os valores dos deslocamentos químicos da betulina (substrato do experimento) com os valores da substância obtida.

TABELA 17: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS COMPARATIVOS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA BETULINA E DA SUBSTÂNCIA **8** ( $\text{CDCl}_3$ , 50MHz).

C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})^1$	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})^2$	C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})^1$	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})^2$
1	38,8	39,8	16	29,2	29,3
2	27,2	34,3	17	47,8	48,0
3	78,9	---	18	48,8	48,9
4	38,9	47,6	19	47,8	47,6
5	55,3	55,2	20	150,6	150,3
6	18,3	19,9	21	29,8	29,9
7	34,3	33,7	22	34,0	34,2
8	40,9	41,1	23	28,0	26,8
9	50,4	50,0	24	15,4	21,2
10	37,2	37,1	25	16,1	16,2
11	20,9	21,6	26	16,0	16,0
12	25,3	25,5	27	14,8	14,9
13	37,3	37,7	28	60,2	60,8
14	42,7	43,0	29	109,6	110,0
15	27,0	27,2	30	19,1	19,3

<sup>1</sup> Dados de literatura da betulina, M AHATO & KUNDU, 1994

<sup>2</sup> RMN  $^{13}\text{C}$  dados experimentais referente a substância **8** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

--- dado não identificado no experimento

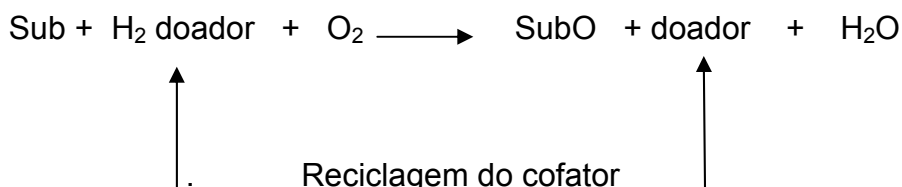
#### 4.4.4 Mecanismo de reação de oxidação por via enzimática

Os compostos apresentados anteriormente foram oxifuncionalizados em decorrência das enzimas dos fungos presentes no meio reacional. Processo semelhante pode ser observado no organismo dos mamíferos. Os fármacos, assim como outros agentes químicos estranhos ao organismo – xenobióticos, são metabolizados principalmente pelas enzimas microssômicas hepáticas, em que se destacam uma hemoproteína oxidativa denominada citocromo  $\text{P}_{450}$  e uma flavoproteína, NADPH - Citocromo c redutase, que associadas a lipídeos, formam o sistema MFO (oxidase de função mista). O citocromo  $\text{P}_{450}$  ou CYP450 é uma família de enzimas encontradas em várias espécies, incluindo a espécie humana e os organismos procarionetes.

Como dito anteriormente (pág. 6), a primeira etapa do metabolismo dos medicamentos – fase I – se caracteriza por envolver reações redox ou hidrolíticas, responsável pela conversão do fármaco em um metabólito mais polar. Esta etapa, na maioria das vezes envolve o CYP450 hepático e compreende, basicamente, na

inserção de um átomo de oxigênio originário de uma molécula de  $O_2$ , na estrutura do fármaco, por isso essas enzimas são chamadas de monoxigenases como mostra genericamente o esquema 12:

ESQUEMA 12 : MECANISMO GERAL DAS MONOXIGENASES.



Embora o mecanismo de reação das oxigenases difira com o subtipo de enzima, o modo de ativação do oxigênio é o mesmo. Inicialmente o oxigênio molecular é ativado por um agente redutor, o NADH ou NADPH. O oxigênio ativado é transferido por intermédio de cofatores contendo metais de transição ( $Fe^{+2}$  ou  $Cu^{+2}$ ) ou por sistemas heteroaromáticos, como as flavinas. O ciclo catalítico que envolve as proteínas transportadoras de elétrons que contêm ferro é realizado pelos citocromos. O esquema 13 mostra o ciclo catalítico; inicialmente o íon  $Fe^{+3}$  é coordenado equatorialmente por um grupo prostético heme e por um átomo de enxofre de um resíduo de cisteína. Posteriormente o substrato é ligado à unidade porfirínica, substituindo uma molécula de água. Nesta etapa o íon férrico  $Fe^{+3}$  é reduzido para o seu estado ferroso  $Fe^{+2}$ . Simultaneamente, um elétron é liberado do NADH ou NADPH através de um outro cofator como um citocromo.

Na etapa seguinte, o oxigênio molecular é ligado a unidade porfirínica formando o complexo dioxigênio com o citocromo P-450 quando um elétron é liberado do NADH ou NADPH levando a clivagem da ligação O-O. Assim, um átomo de oxigênio é utilizado para formar uma molécula de água e o outro para formar a espécie de ferro oxidado  $Fe^{+4}$  ou  $Fe^{+5}$ . Finalmente o ciclo catalítico se completa com o ataque destes eletrófilos fortes ao substrato, liberando o produto oxidado, SubO, e regenerando a espécie reduzida  $Fe^{+3}$  (FABER, 1997; COMASSETO, 2002).



#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS DO ESTUDO FITOQUÍMICO DE *P. orientalis* L.

O estudo fitoquímico do *P.orientalis* foi realizado com o intuito de verificar a presença do ácido betulônico e betulina. Na tentativa de se obter esses compostos foram isolados os compostos EP-1, EP-2 e EP-3 sendo que os dois primeiros foram identificados e o terceiro não despertou interesse, visto que, dados preliminares dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  mostraram tratar-se de um ácido graxo (fig. 67 e 68 pág. 99) Infelizmente o ácido betulônico e a betulina não foram isoladas.

- **Substância EP-1 -  $\beta$ -sitosterol**

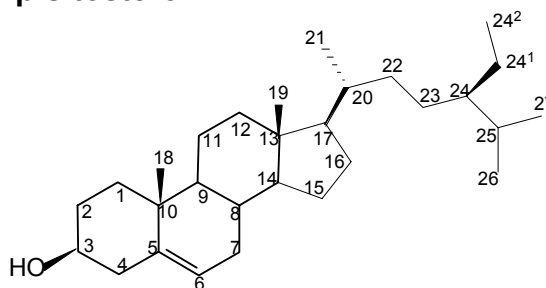


FIGURA 15: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA EP-1

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (fig. 59; pág. 96) verificou-se sinais intensos na região de 0,7 a 2,2 ppm relacionados aos grupos metila e metilênicos. Observou-se os simpletos para as metilas em  $\delta_{\text{H}}$ : 0,65; 0,68; 0,70; 0,80; 0,80 e 1,19 (3H; s; H-18; H-19; H-21; H-26; H-27; H-29), multipletto centrado em  $\delta_{\text{H}}$ : 3,55 (1H; m; H-3) e em  $\delta_{\text{H}}$ : 5,4 (1H; s; H-6).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT (fig. 60 e 61; pág. 96 e 97) mostraram a existência de 29 sinais de carbono, sendo que destes, 6 eram referentes a carbonos metílicos, 10 metilênicos sendo um oxigenado em  $\delta_{\text{C}}$ :71,8 (C-3), 11 metínicos e 2 carbonos quaternários. O composto apresentou uma insaturação em  $\delta_{\text{C}}$ :121,7-140,8 característica a posição C-6 e C-5. Estes sinais evidenciaram que este composto era um triterpenoide esteroidal. A comparação dos dados com os da literatura (MACARI, *et al.*, 1990) permitiu identificar o composto EP-1 como  $\beta$ -sitosterol conforme estrutura acima. A tabela 18 mostra as atribuições dos sinais de carbono. O  $\beta$ -sitosterol é encontrado com frequência como metabólito secundário das plantas.

TABELA 18: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS COMPARATIVOS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DO  $\beta$ -SITOSTEROL ( $\text{CDCl}_3$ , 50MHz)

C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})^1$	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})^2$	C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})^1$	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})^2$
1	37,2	37,3	16	28,1	28,3
2	31,6	31,9	17	56,1	56,0
3	71,7	71,8	18	11,9	11,9
4	36,4	36,4	19	19,3	19,4
5	140,7	140,8	20	36,0	36,2
6	121,6	121,7	21	18,7	18,8
7	31,8	31,6	22	33,9	33,9
8	31,8	31,6	23	26,1	26,0
9	50,1	50,1	24	45,8	45,8
10	36,5	36,5	25	29,1	29,1
11	21,1	21,1	26	19,6	19,8
12	39,7	39,8	27	18,9	19,0
13	42,3	42,3	24 <sup>1</sup>	23,0	23,0
14	56,7	56,8	24 <sup>2</sup>	11,9	12,0
15	24,2	24,3			

1 - Dados de literatura para o  $\beta$ - sitosterol, MACARI *et al.*, 1990 ( $\text{CDCl}_3$ , 25MHz);

2 - RMN  $^{13}\text{C}$  dados experimentais para o  $\beta$ - sitosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 50MHz)

• **Substância EP- 2 – Ácido diidrobetulínico**

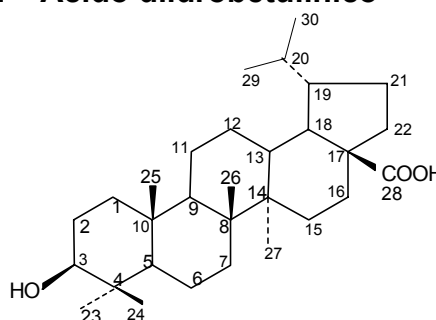


FIGURA 16: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA EP-2

A identificação estrutural do composto EP-2 foi feita com base na análise de seus espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (fig. 62-66; pág. 97-99). Análises preliminares mostraram se tratar de um triterpeno de esqueleto lupano.

O espectro de  $^1\text{H}$  mostrou os simpletos referente a 5 metilas  $\delta_{\text{H}}$ : 0,76; 0,81; 0,94; 0,97; 1,02; (3H; H-26, H-25, H-23, H-24, H-27); duplete em  $\delta_{\text{H}}$ : 0,75 e 0,86 (3H, d, J=7; H-29 e H-30); duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$ : 3,21 (1H, dd, J=5,2; 18,8; H-3); multiplete em  $\delta_{\text{H}}$ : 3,3 (1H, m, H-19); simpleto em  $\delta_{\text{H}}$ : 2,18 (1H, s, H-20). Ao confrontar estes dados com o ácido betulínico verificou-se a ausência do grupo isoprenil terminal cujos sinais característicos para H-29 encontram-se em torno de  $\delta_{\text{H}}$ : 4,75 e 4,65.

A comparação dos sinais  $^{13}\text{C}$  e DEPT mostraram a presença de 7 carbonos metílicos, 10 metilênicos, 7 metínicos sendo um ligado a hidroxila  $\delta_{\text{C}}$ : 78,7 e 6 carbonos quaternários sendo um  $\text{sp}^2$  carboxílico  $\delta_{\text{C}}$ : 179,04. A análise HMQC mostrou os pares correlacionados ( $\delta_{\text{H}}$ : 3,3 -  $\delta_{\text{C}}$ : 51,4;  $\delta_{\text{H}}$ : 3,2-  $\delta_{\text{C}}$ : 78,7;  $\delta_{\text{H}}$ : 2,18-  $\delta_{\text{C}}$ : 30,18).

De acordo com as informações expostas, a estrutura proposta para o composto EP-2 é o ácido diidrobetulínico [ $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3$ ], a qual é inédita como produto natural. Fujioka *et al.* (1994) haviam obtido este composto por derivatização química a partir do ácido betulínico e testado sua atividade para HIV verificando que se trata de um inibidor da replicação viral mais potente que o composto de origem. Da mesma forma Kim *et al.* (2001) obtiveram o ácido diidrobetulínico e verificaram que ao ser comparado ao ácido betulínico este composto mantém a atividade frente adenocarcinoma de próstata humana e ao melanoma. Posteriormente, Chowdhury *et al.* (2003), mostraram que esse ácido é um potente agente antileishmaniose, doença, que atinge muitas pessoas ainda hoje, provocada pelo parasita *Leshmanania donovani*.

A tabela 19 mostra as atribuições dos sinais de  $^1\text{H}$  aos respectivos  $^{13}\text{C}$  para o ácido diidrobetulínico.

TABELA 19: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  E DE  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 e 400 MHz)

C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$	C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$
1	38,7		16	31,9	2,35
2	27,4	1,50 (m)	17	56,2	-
3	78,7	3,20	18	49,4	2,10
4	38,9	-	19	51,4	3,30
5	55,3	0,68	20	30,1	2,18
6	18,3	1,50 (m)	21	28,5	1,10
7	34,3	1,38 (m)	22	36,9	2,00 (m)
8	40,6	-	23	28,0	0,94 (s)
9	50,5	1,25 (m)	24	15,4	0,97 (s)
10	37,3	-	25	16,0	0,81 (s)
11	20,9	1,45	26	16,1	0,76 (s)
12	27,4	1,65	27	14,7	1,02 (s)
13	37,4		28	179,0	-
14	42,3	-	29	15,4	0,75 (d)
15	29,8	1,20	30	16,0	0,86 (d)

## 5 CONCLUSÃO

As transformações microbianas são uma alternativa para a produção de derivados de composto com moléculas complexas em posições geralmente inacessíveis aos reagentes químicos tradicionais. O ácido betulínico (I), ácido betulônico (II) e betulina (III) devido a suas propriedades farmacológicas tornaram-se interessantes para o desenvolvimento desse estudo.

Através do estudo fitoquímico do *Platanus orientalis* L. foi possível isolar o  $\beta$ -sitosterol, ácido betulínico e o ácido diidrobetulínico que é inédito como produto natural, porém não foi possível comprovar ou não presença do ácido betulônico e da betulina em seu extrato. Devido a isso, o ácido betulônico foi obtido por derivatização química a partir do ácido betulínico enquanto que a betulina foi adquirida da Sigma-Aldrich.

A partir da casca de *P. orientalis* foram isolados e identificados 13 gêneros de fungos epifíticos e 8 endofíticos.

Para a biotransformação dos substratos, experimentos iniciais foram realizados com os fungos isolados da casca de *P. orientalis* e fungos obtidos junto a outros pesquisadores. Devido à formação de derivados, os fungos *Chaetophoma* sp., *Colletrotrichum* sp. e *Dematium* sp. foram selecionados para as transformações microbianas com o ácido betulínico. Os fungos *Arthobotrys* sp., *Chaetophoma* sp. e *Colletrotrichum* sp. para o ácido betulônico e o *Chaetophoma* sp. para a betulina.

Foram isolados e identificados dois compostos derivados do ácido betulínico pela biotransformação de fungos sendo um inédito, sete metabólitos do ácido betulônico sendo cinco inéditos e um da betulina. As substâncias de origem foram oxifuncionalizadas devido à ação enzimática dos fungos, sendo que esse comportamento é semelhante ao que ocorre no sistema hepático dos mamíferos.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, W.R.; KIESLICH, K.; STUMPF, B.; ERNST, L. Microbial oxidation of tricyclic sesquiterpenoids containing a dimethylcyclopropane ring. **Phytochemistry**. v.31, n.11, p.3749-3755, 1992.

AKIHISA, T.; TAKAMINE, Y.; YOSHIZUMI, K.; TOKUDA, H.; KIMURA, Y.; UKIYA, M.; NAKASHARA, T.; YOKOCHI, T.; ICHIISHI, E.; NISHINO, H. Microbial transformations of two lupane-type triterpenes and anti-tumor-promoting effects of the transformation products. **Journal of Natural Products**. v.6, n.3, p.278-282, 2002.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; LACAVA, P.T. **Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos**. CALQ, Piracicaba, 2002, 86p.

ARX, J.A. Von **The genera of fungi sporulation in pure culture**. 2 ed. Vaduz J. Cramer, 1974. 351p.

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. In: **Advances in biochemical engineering biotechnology**. Nova York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v.63, p.169-218, 1998.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Electronic Journal of Biotechnology** (on line). v.3, p. 40-65, 2000.

BARNETT H.C. & HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. New York, Burgess Publ. 1986. 241p.

BARREIRO, E.J.; SILVA, J.F.M.; FRAGA, C.A M. Noções básicas do metabolismo de fármacos. **Química Nova**. v.19, n.6, p.641-650, 1996.

BELTER, P.A.; CUSSLER, E.L.; HU, W.S. **Bioseparations-downstream processing for biotechnology**. Nova York: John Wiley of Sons. 1988.

BRINGMANN, G.; SAEB, W.; ASSI, L.A.; FRANÇOIS, G.; SANKARA NARAYANAN, A.S.; PETERS, K.; PETERS, E.M. Betulinic acid: isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester. **Planta Medica**. v.63, p.255-257, 1997.

CARPENTER, R.C.; SOTHEESWARAN, S.; SULTANBAWA, U.S. <sup>13</sup>C NMR studies of some lupane and taraxerane triterpenes. **Organic Magnetic Resonance**. v.14, n.6, p.462-465, 1980.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Fungos associados à semente de milho produzida nas regiões sul e sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. v.23, n.3, p.370-373, 1998

CHARNEY, W. & HERZOG, H.L. **Microbial transformations of steroids – A handbook**. New York: Academic Press, 1967

CHATTERJEE, P., PEZZUTTO, J.M, KOUZI, S.A. Glucosidation of betulinic acid by *Cunninghamella* species. **Journal Natural Products**. v.62, p.761-763, 1999.

CHATTERJEE, P.; KOUZI, S.A.; PEZZUTTO, J.M; HAMANN, M.T. Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. **Applied Environmental Microbiology**. v.66, p.3850-3855, 2000.

CHOWDHURY, A.R.; MANDAL, S.; GOSWAMI, A.; GHOSH, M.; CHAKRABORTY, D.; GANGULY, A.; TRIPATHI, G.; MUKHOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H.K. Dihydrobetulinic acid, induces apoptosis in *Leishmania donovani* by targeting DNA topoisomerase I ell: implications in antileishmanial therapy. **Molecular Medicine**. v.9, p.26-36, 2003.

CICHEWICZ, R.H. & KOUZI, S.A. Chemistry, biological activity and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. **Medicinal Research Reviews**. v.24, n.1, p.90-114, 2004.

CÎNȚĂ PÎNZARU, S.; LEOPOLD, N.; KIEFER, W. Vibrational spectroscopy of betulinic acid HIV inhibitor and of its birch bark natural source. **Talanta**. v.57, p.625-631, 2002.

COMASSETO, J.V. **Apostila do workshop em biocatálise**. Instituto de química UNICAMP, 2002.

CRUEGER, W. & CRUEGER, A. **Biotecnologia: manual de microbiologia industrial**. 3<sup>a</sup> ed. Zaragoza: Editorial Acribia S.A. 1993. 413p.

DRAGER, B.; GALGON, T.; NEUBERT, R.; WOHLRAB, W. Method of producing betulinic acid. US Patent 6 175 035 B1, 2001.

ELLIS, M.B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Survey Commonwealth Mycological Institut. 1976. 315p.

EVERS, M.; POUJADE, C.; SOLER, F.; RIBEILL, Y.; JAMES, C.; LELIÈVRE, Y.; GUEGUEN, J.C.; REISDORF, D.; MORIZE, I.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E.; HÉNIN, Y.; BOUSSEAU, A.; MAYAUX, J.F; LE PECQ, J.B.; DEREU, N. Betulinic acid derivatives: a new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action. **Journal of Medicinal Chemistry**. v.39, n.5, p.1056-1068, 1996.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 3a. ed. Germany: Springer-Verlag Heidelberg. 1997. 402p.

FERNANDES, J.; CASTILHO, R.O.; COSTA, M.R.; SOUZA, K.W.; KAPLAN, M.A.C.; GATTASS, C.R. Pentacyclic triterpenes from *Chrysobalanaceae* species: cytotoxicity

on multidrug resistant and sensitive leukaemia cell lines. **Cancer Letters**. v.190, p.165-169. 2003

FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y.; KILKUSKIE, R.E.; COSENTINO, L.M.; BALLAS, L.M.; JIANG, J.B.; JANZEN, W.P.; CHEN, I.S.; LEE, K.H. Anti-aids agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. **Journal of Natural Products**. v.57, n.2, p.243-247, 1994.

FULDA, S.; FRIESEN, C.; LOS, M.; SCAFFIDI, C.; MIER, W.; BENEDICT, M.; NUNEZ, G.; KRAMMER, P.H.; PETER, M.E.; DEBATIN, K.M. Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas) and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. **Cancer Research**. v.57, n.21, p.4956-4964, 1997.

GALGON, T.; HOKE, D.; DRAGER, B. Identification and quantification of betulinic acid. **Phytochemical Analysis**. v.10, p.187-190, 1999.

GLAZER, A. N. & NIKALDO, H. **Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. 2 ed. Nova York: W.H. Freeman & Co. 1995. 660p.

HATA, K.; HORI, K.; TAKAHASHI, S. Differentiation- and apoptosis-inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line. **Journal Natural Products**. v.65, p.645-648, 2002.

HATA, K.; HORI, K.; OGASAWARA, H.; TAKAHASHI, S. Anti-leukemia activities of lup-28-al-20(29)-en-3-one, a lupine triterpene. **Toxicology Letters**. v.143, p.1-7. 2003

HANSON, J. R. The microbiological transformation of diterpenoids. **Natural Products Reports**. v.8, p.139-151, 1992.

KASHIWADA, Y.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. H.; CHEN, C. H.; HASHIMOTO, F.; GARRET, P. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. **Journal Medicinal Chemistry**. v.39, n.5, p.1016-1017, 1996.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; WANG, H. K; SUN, I. C; SHEN, J. K.; YANG, L. M. Anti-AIDS agents. 34. Synthesis and structure-activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents. **Journal Medicinal Chemistry**. v.41, n.23, p.4648-4657, 1998a.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; WANG, H. K; NAGAO, T.; KITANAKA, S.; YASUDA, I.; FUJIOKA, T.; YAMAGISHI, T.; KOSUKA, M.; OKABE, H.; IKESHIRO, Y.; HU, C.Q.; YEH, E. Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. **Journal Natural Products**. v.61, n.9, p.1090-1095, 1998b.

KASHIWADA, Y.; NAGAO, T.; HASHIMOTO, A.; IKESHIRO, Y.; OKABE, H.; COSENTINO, L.M.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents 38. Anti-HIV activity of 3 -O-acyl ursolic acid derivatives **Journal of Natural Products**. v.63, p.1619-1622, 2000.

KASHIWADA, Y.; CHIYO, J.; IKESHIRO, Y.; NAGAO, T.; OKABE, H.; CONSENTINO, L.M.; FOWKE, K.; LEE, K.H. 3,28-di-O-(dimethylsuccinyl)-betulin isomers as anti-HIV agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.11, p.183-185, 2001.

KERN, M.E. & BLEVINS, K.S. Micologia médica 2 ed. São Paulo: ed.Premier. 1999. 256p.

KIM, D.S.H.L.; PEZZUTO, J.M.; PISHA, E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.8, p.1707-1712, 1998.

KIM, D.S.H.L.; JEONG, H.J.; CHAI, H.B.; PARK, S.Y. Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.9, p.1201-1204, 1999.

KIM, J.Y.; KOO, H.M.; KIM, D.S.H.L. Development of C-20 modified betulinic acid derivatives as antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.11, p.2405-2408, 2001.

KERR, J.F.R.; GOBÉ, G.C.; WINTERFORD, C.M.; HARMON, B.V. Anatomical methods in cell death. In: SCHWATZ, L.M. & OSBORNE, B.A. **Cell Death**. California: Academic Press. 1995. p.1-27

KOUZI, S.A.; CHATTERJEE, P.; PEZZUTO, J.M.; HAMANN, M.T. Microbial transformations of antimelanoma agent betulinic acid. **Journal of Natural Products**. v.63, n.12, p.1653-1657, 2000.

LEADLAY, P.F. **Introduction to enzyme chemistry**. Reino Unido:Athenaeum Press Ltd. 1993. 82p.

MACARI, P.A.T.; EMERENCIANO, V.P.; FERREIRA, Z.M.G.S. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicans* triana através de análise por microcomputador. **Química Nova**. v.13, n.4, p.260-262, 1990.

MAHATO, S.B.; NANDY, A.K.; KUNDU, A. P. C-NMR spectra of pentacyclic tripterpenoid – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**. v.37, p.1517-1575, 1994.

MELZIG, M.F. & BORMANN, H. Betulinic acid inhibits aminopeptidase N activity. **Planta Medica**. v.64, n.7, p.655-657, 1998.

NETO, P.A.S., AZEVEDO, J.L. & ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia**. v.29, p.62-76, 2002.

PATEL, R. N. Stereoselective biotransformations in synthesis of some pharmaceutical intermediates. In: **Advanced Applied Microbiology**. v.43, p. 91-140, 1997.

PAVLOVA, N.I.; SANINOVA, O.V.; NIKOLAEVA, S.N.; BOREKO, E.I.; FLEKHTER, O.B. Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses. **Fitoterapia**. v.74, p.489-492, 2003.

PELCZAR, M.J.; CHAN, Z.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia – conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo: Makron Books do Brasil Editora. v.1. 1996

PENG, C.; BODENHAUSEN, G.; QIU, S.; FONG, H.H.S.; FARNSWORTH, N.R.; YUAN, S.; ZHENG, C. Computer-assisted structure elucidation: application of CISOC-SES to resonance assignment and structure generation of betulinic acid. **Magnetic Resonance in Chemistry**. v.36, p.267-278, 1998.

PISHA, E.; CHAI, H.; LEE, I.S.; CHAGGWEDERA, T.E.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; BEECHER, C.W.; FONG, H.H.; KINGHORN, A.D.; BROWN, D.M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. **Natural Medicine**. v.1, n.10, p.1046-1051, 1995.

RAMADOSS, S. & SIDDIQUI, M.J.A. Extracting betulinic acid from *Ziziphus jujube*. US Patent 6 264 998 B1, 2001.

RECIO, M.C.; GINER, R.M.; MÁNEZ, S.; GUEHO, J.; JULIEN, H.R.; HOSTETTMANN, K.; RIOS, J.L. Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. **Planta Medica**. v.61, n.1, p.9-12, 1995.

SAUTER, M. Process for obtaining betulinic acid. US Patent 0149286, 2003

SCHMIDT, M.L.; KUZMANOFF, K.L.; LING-INDECK, L.; PEZZUTO, J.M. Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. **European Journal of Cancer**. v.33, n.12, p. 2007-2010, 1997.

SILVEIRA, V.D. **Micologia**. 5 ed. Rio de Janeiro. Ambito Cultural Edições Ltda. 1995. 336p.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**. v.260, p.214-216, 1993.

STOUDT, T.H The microbiological transformation of steroids em **Advanced Applied Microbiology**. 2<sup>a</sup>.ed. 1960.

STROBEL, G.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R.S.; HESS, W.M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**. v.142, p.435-440, 1996.

STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**. v.5, p.535-544, 2003.

VÉZINA, C. Biotransformaciones. In: BU'LOCK J. & KRISTIANSEN,B. **Biotecnología Basica**. Zaragoza:Editorial Acribia S.A 1991. p.463-482.

VOGEL, A I. **Vogel's textbook of pratical organic chemistry**. 5 ed. Nova York. Longman Scientific & Technical, 1989. 1514p.

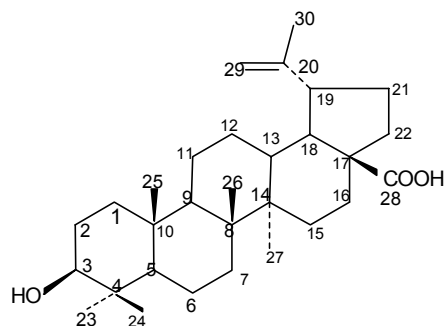
WANG, B.H. & POLYA, G.M. Selective inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by amphiphilic triterpenoids and related compounds. **Phytochemistry**. v.41, n.1, p.55-63, 1996.

YOGEEESWARI, P. & SRIRAM, D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. **Current Medicinal Chemistry**. v.12, p.763-771, 2005.

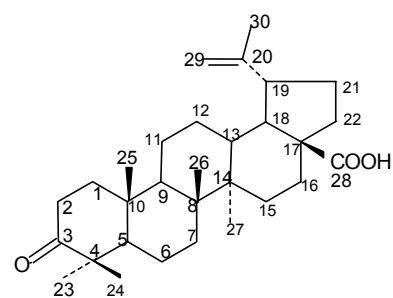
## 7 ANEXO

TABELA 20 : VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICO (ppm) DE RMN  $^{13}\text{C}$  DOS DERIVADOS OBTIDOS POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO BETULÍNICO

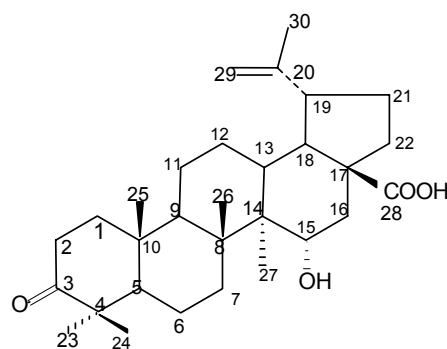
C	Ácido Betulínico	Ácido Betulônico	4/12	9
1	39,3	39,6	39,7	39,9
2	28,3	34,0	34,1	34,2
3	78,1	---	---	---
4	39,5	47,4	47,4	47,4
5	55,9	55,0	55,0	54,6
6	18,8	19,7	19,7	19,8
7	34,8	33,7	33,7	36,9
8	41,1	40,7	40,7	42,3
9	50,9	49,9	49,9	50,4
10	37,5	37,0	37,0	37,2
11	21,2	21,4	21,4	21,5
12	26,1	25,5	25,5	25,5
13	38,6	38,5	38,5	38,0
14	42,9	42,5	42,5	47,3
15	30,3	29,7	29,7	70,9
16	32,9	32,1	32,1	42,3
17	56,6	56,3	56,3	55,2
18	49,8	49,3	49,3	48,9
19	47,8	46,9	46,9	46,5
20	151,3	150,3	150,3	149,8
21	31,2	30,6	30,6	31,0
22	37,6	37,0	37,0	37,0
23	28,7	26,7	26,7	26,6
24	16,3	21,0	21,0	21,0
25	16,4	15,9	15,9	16,0
26	16,4	16,0	16,0	16,3
27	14,9	14,6	14,6	8,2
28	178,8	180,5	180,5	180,5
29	109,9	109,8	109,8	110,1
30	19,5	19,4	19,4	19,5



Ácido betulínico



Substâncias 4 e 12  
Ácido betulônico



Substância 9

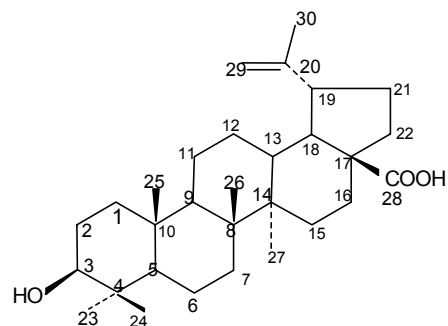


TABELA 21 : VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICO (ppm) DE RMN  $^{13}\text{C}$  DOS DERIVADOS OBTIDOS POR BIOTRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO BETULÔNICO

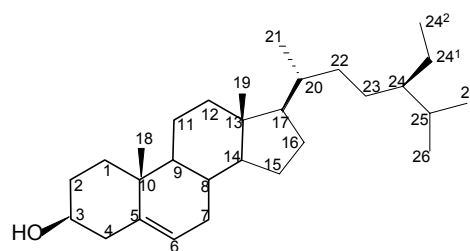
C	Ácido Betulônico	1	2	3/11	6	7	10
1	39,7	39,3	39,3	39,5	39,6	29,9	39,9
2	34,1	34,0	34,0	34,1	34,0	34,2	34,2
3	---	---	---	---	---	---	---
4	47,4	46,6	46,9	46,9	47,3	47,0	47,3
5	55,0	52,4	52,4	52,1	54,8	51,4	54,6
6	19,7	32,5	33,4	31,0	19,7	20,8	19,8
7	33,7	74,4	74,4	72,8	33,7	33,7	37,0
8	40,7	48,9	46,6	47,9	40,6	40,5	42,3
9	49,9	49,8	49,8	48,7	49,2	42,1	50,4
10	37,0	36,9	36,9	37,0	36,9	41,4	37,2
11	21,4	21,4	21,5	21,1	27,2	22,7	21,5
12	25,5	25,5	26,9	25,1	72,6	25,8	25,5
13	38,5	38,7	38,7	37,2	51,2	38,4	38,0
14	42,5	43,8	43,8	48,6	42,3	42,9	47,4
15	29,7	29,7	29,7	68,9	29,7	29,4	70,9
16	32,1	33,4	32,3	41,5	31,4	32,5	42,3
17	56,3	56,0	55,9	54,6	56,2	56,4	55,2
18	49,3	48,9	49,7	49,7	37,6	49,3	48,9
19	46,9	47,0	42,7	46,5	49,7	47,0	46,5
20	150,3	150,4	154,7	149,9	149,9	150,9	149,8
21	30,6	30,4	30,5	29,7	28,2	30,7	31,0
22	37,0	36,9	36,8	36,8	36,7	37,3	36,9
23	26,7	26,4	26,4	26,4	26,8	27,3	26,6
24	21,0	21,0	21,0	21,1	21,0	20,4	21,0
25	15,9	15,6	15,6	15,5	15,8	60,4	16,0
26	16,0	9,9	9,9	10,7	15,9	16,2	16,3
27	14,6	14,7	14,7	8,3	14,7	14,6	8,2
28	180,5	181,5	180,1	180,2	180,9	179,0	180,5
29	109,8	109,7	107,0	110,0	109,9	109,5	110,1
30	19,4	19,4	65,3	19,5	19,3	19,4	19,5

TABELA 22: VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN  $^{13}\text{C}$  DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *Platanus orientalis* L.

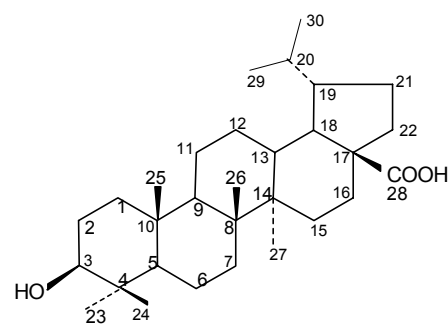
C	Ácido Betulínico <sup>1</sup>	EP-1	EP-2
1	39,3	37,3	38,7
2	28,3	31,9	27,4
3	78,1	71,8	78,7
4	39,5	36,4	38,9
5	55,9	140,8	55,3
6	18,8	121,7	18,3
7	34,8	31,6	34,3
8	41,1	31,6	40,6
9	50,9	50,1	50,5
10	37,5	36,5	37,3
11	21,2	21,1	20,9
12	26,1	39,8	27,4
13	38,6	42,3	37,4
14	42,9	56,8	42,3
15	30,3	24,3	29,8
16	32,9	28,1	31,9
17	56,6	56,1	56,2
18	49,8	11,9	49,4
19	47,8	19,3	51,4
20	151,3	36,0	30,1
21	31,2	18,7	28,5
22	37,6	33,9	36,9
23	28,7	26,1	28,0
24	16,3	45,8	15,4
25	16,4	29,1	16,0
26	16,4	19,6	16,1
27	14,9	18,9	14,7
28	178,8	23,0	179,0
29	109,9	11,9	15,4
30	19,5		16,0



Ácido betulínico



Substância EP-1



Substância EP – 2

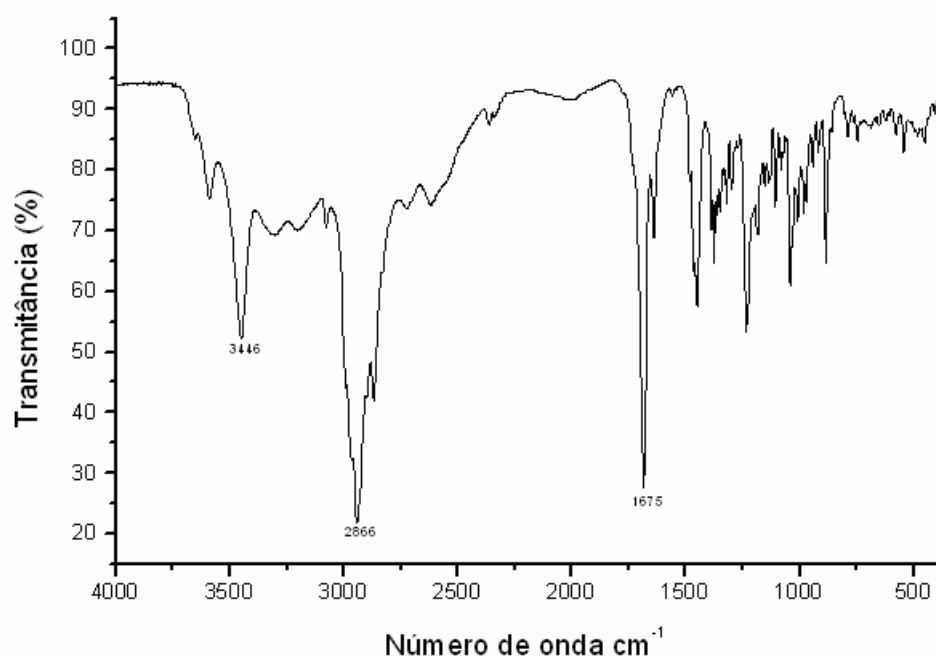


FIGURA 17: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO – ácido betulínico (I)

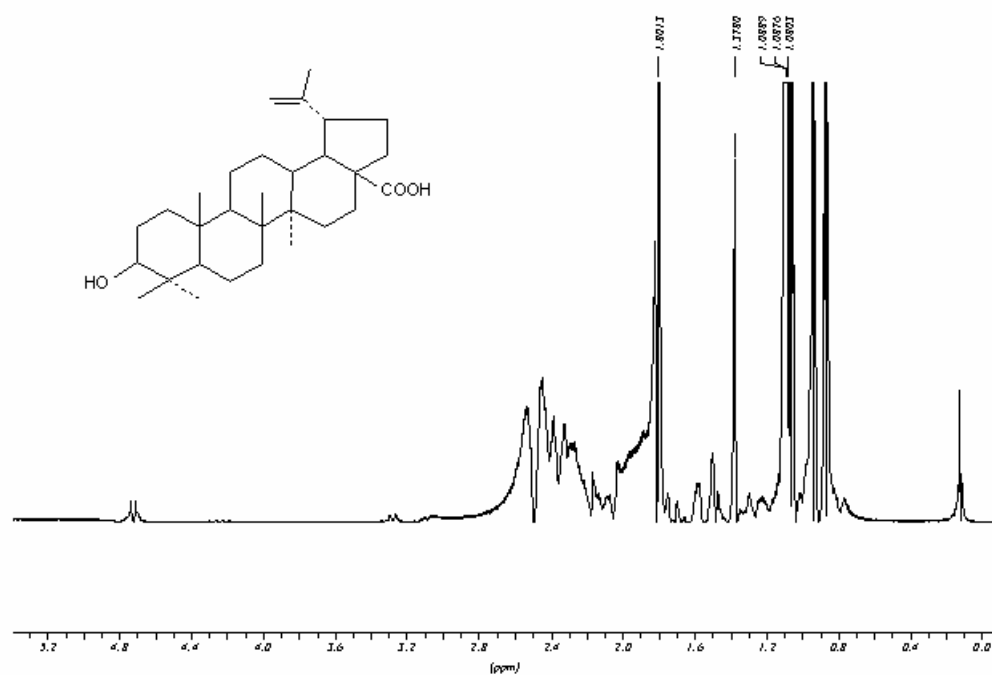


FIGURA 18: ESPECTRO DE RMN DE 1H – ácido betulínico (I) - CDCl<sub>3</sub>; 200MHz

FIGURA 20: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO – ácido betulônico (II)

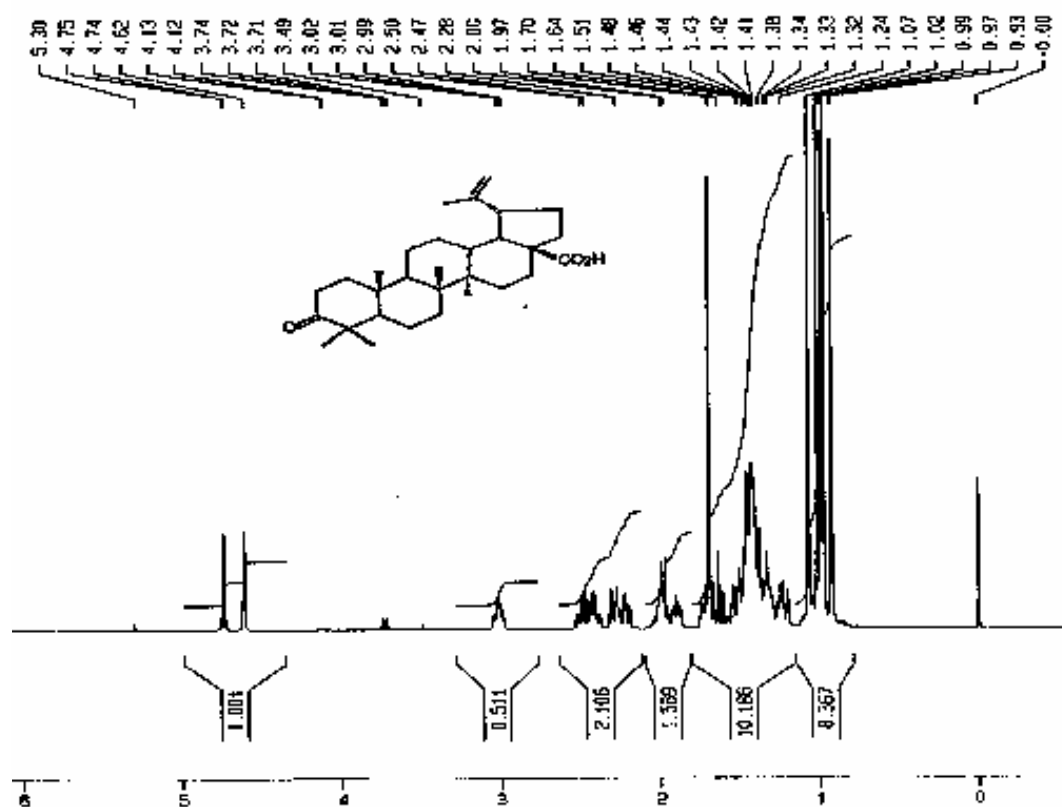


FIGURA 21 : ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup>H – ácido betulônico (II) - CDCl<sub>3</sub>; 400MHz

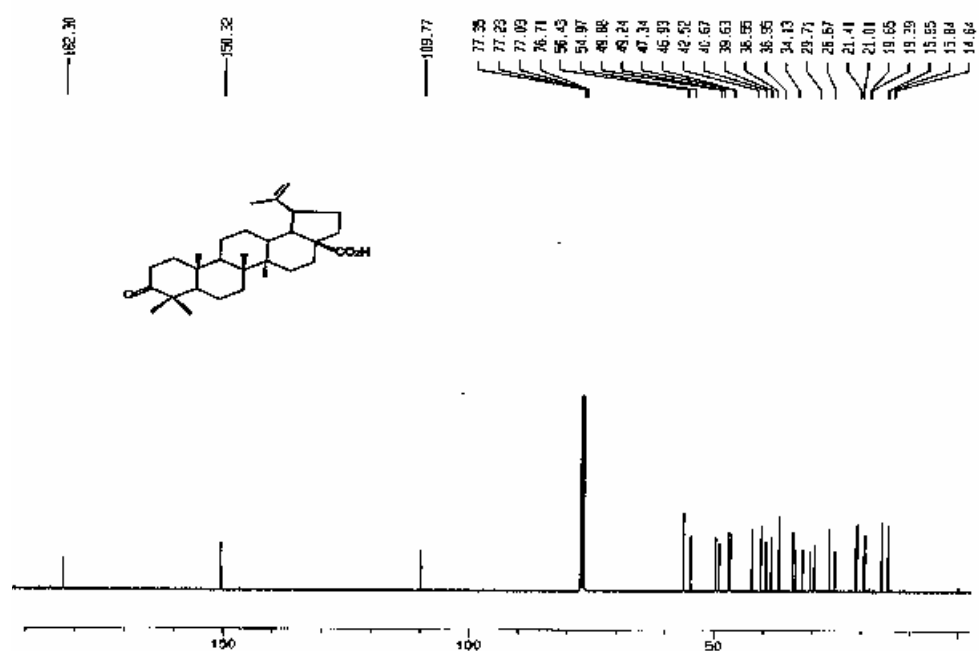


FIGURA 22: ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C – ácido betulônico (II)- CDCl<sub>3</sub>; 100MHz

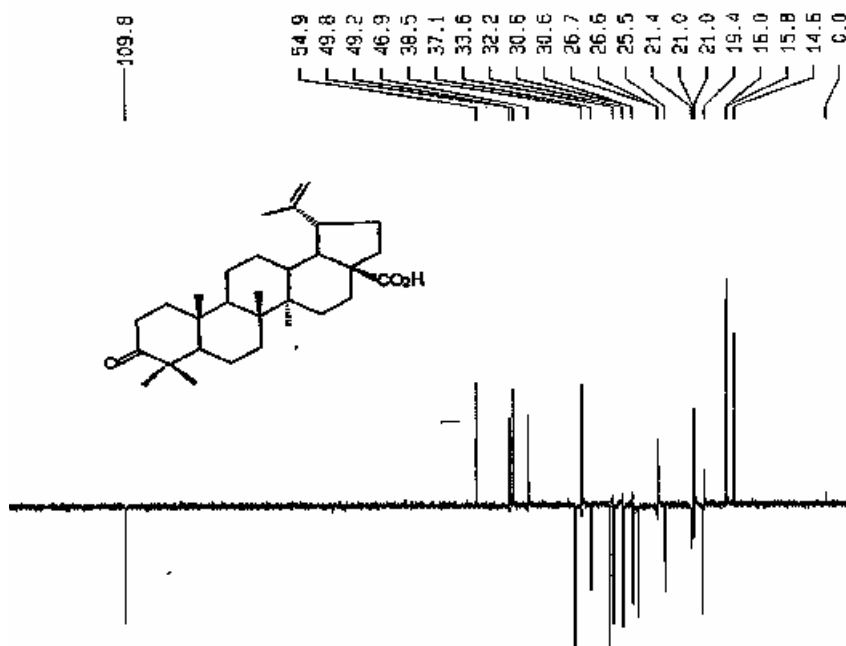


FIGURA 23: ESPECTRO DE DEPT – ácido betulônico (II) - CDCl<sub>3</sub>; 100MHz

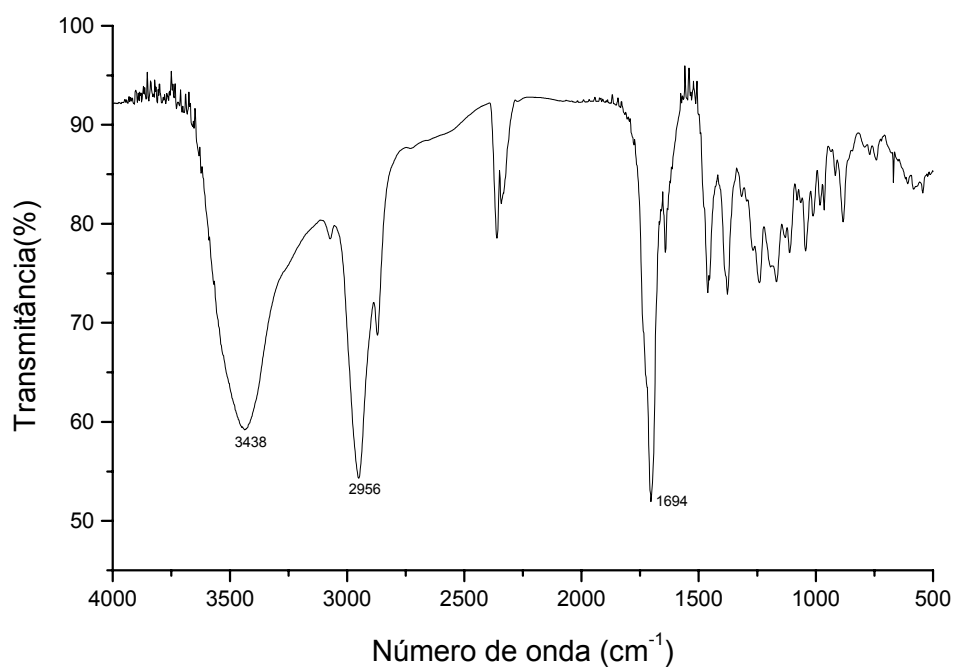


FIGURA 24: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA 1 – ácido 3-oxo, 7β-hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico

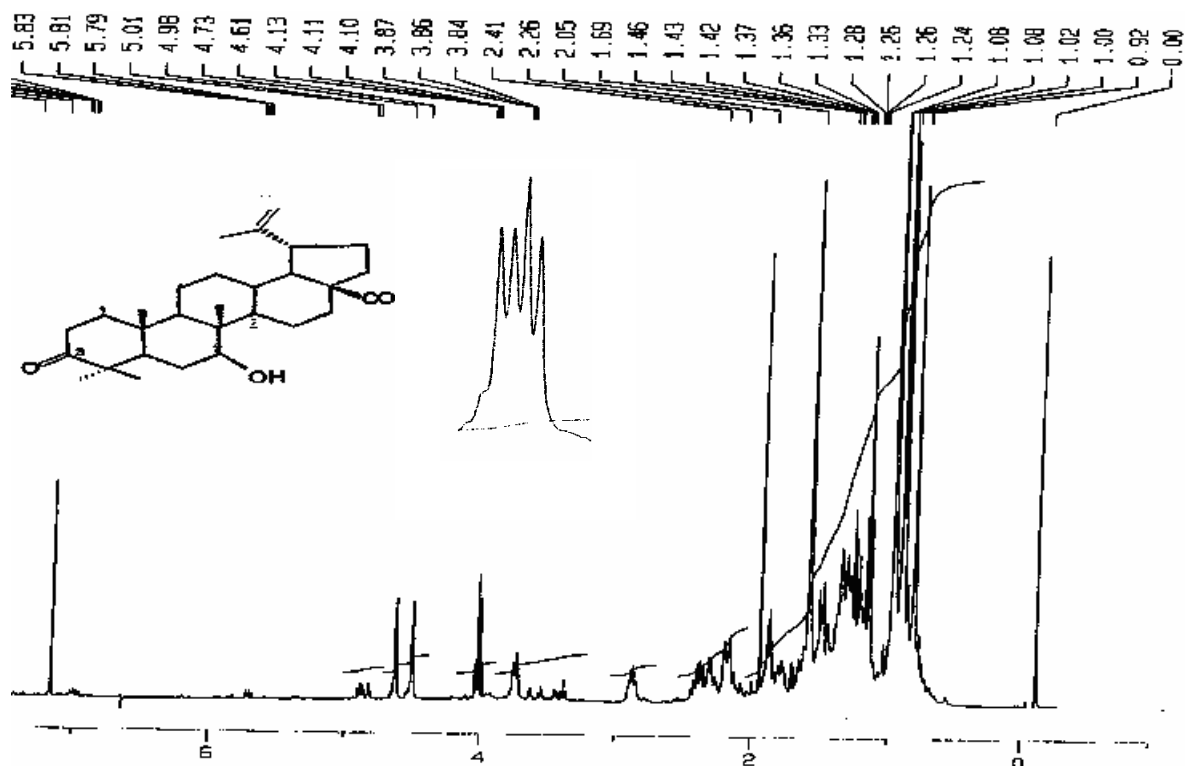


FIGURA 25: ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA 1 – ácido 3-oxo, 7β-hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico -  $\text{CDCl}_3$ ; 400MHz

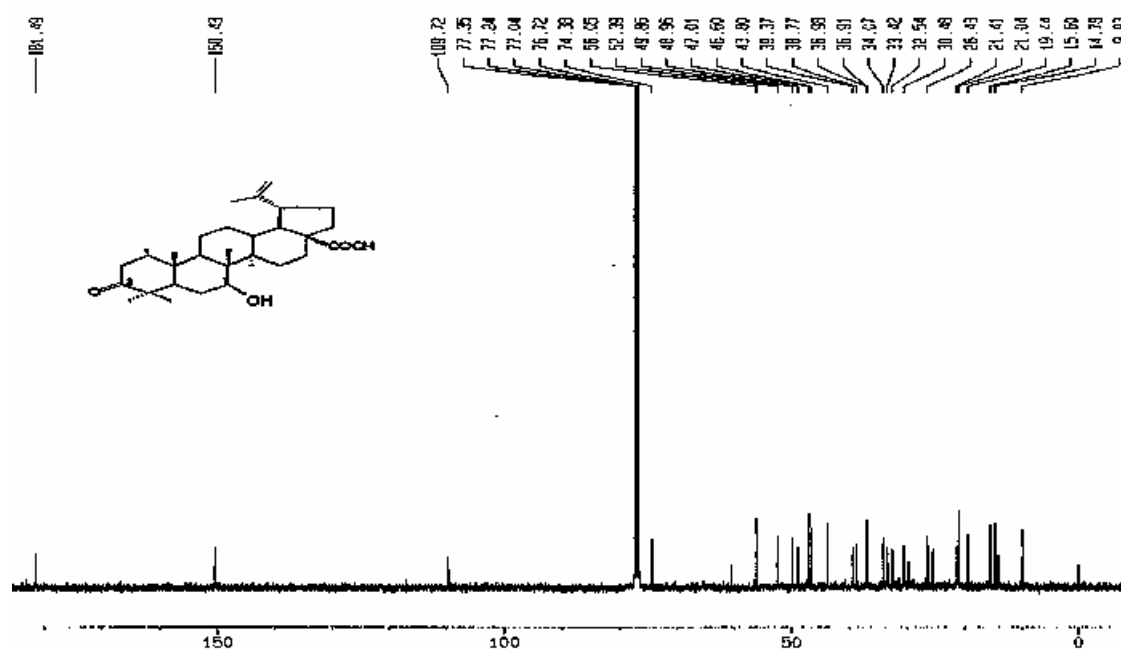


FIGURA 26: ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA 1 – ácido 3-oxo, 7β-hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico-  $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz

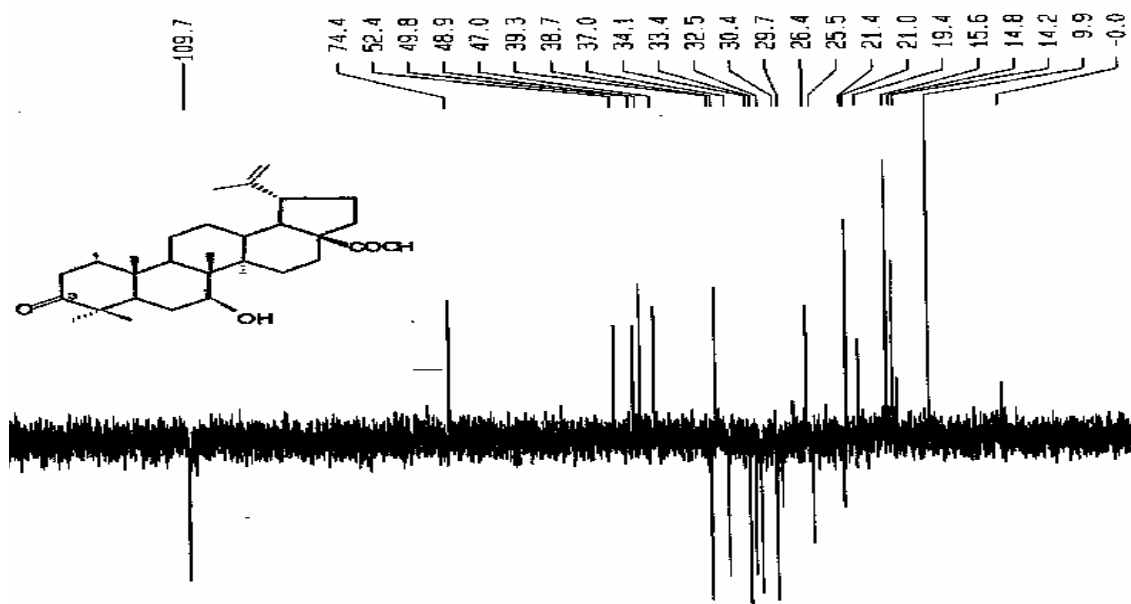


FIGURA 27: ESPECTRO DEPT DA SUBSTÂNCIA 1 – ácido 3-oxo, 7 $\beta$ -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico- CDCl<sub>3</sub>;100MHz

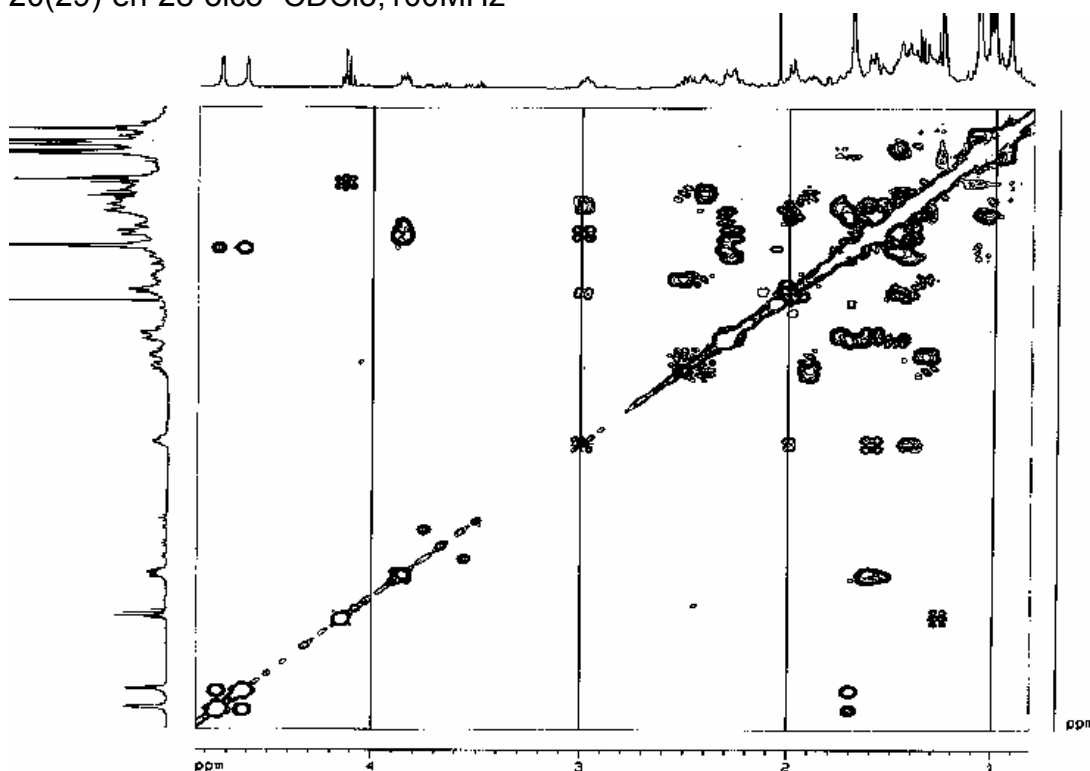


FIGURA 28: MAPA DE CONTORNO COSY DE <sup>1</sup>H DA SUBSTÂNCIA 1 – ácido 3-oxo, 7 $\beta$ -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico - CDCl<sub>3</sub>; 400MHz



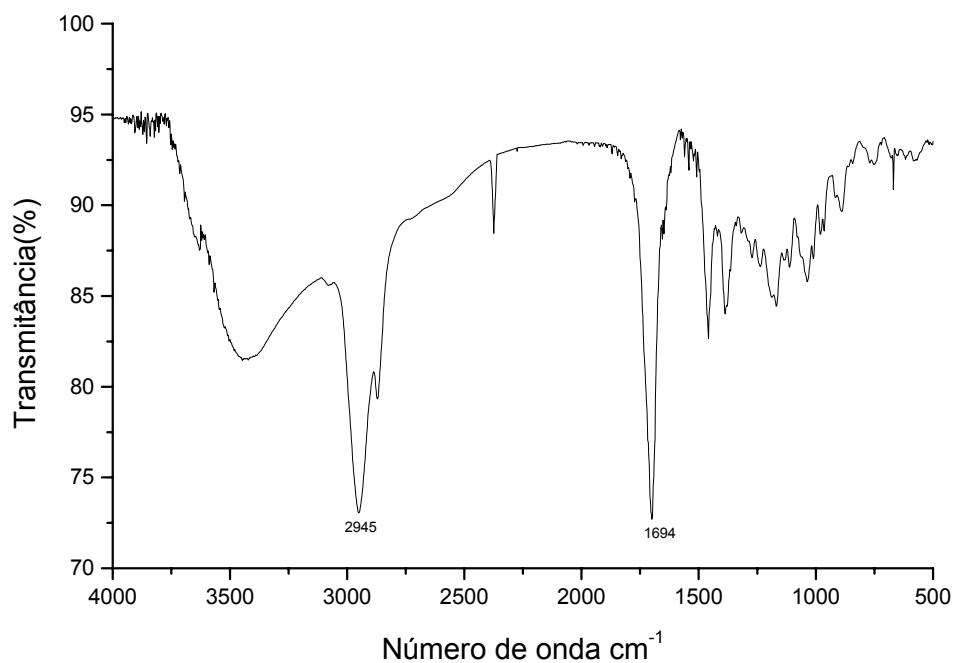


FIGURA 29: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA 2 -  
ácido 3-oxo, 7 $\beta$ , 30-diidroxi-lup-20(29)-en-28-óico

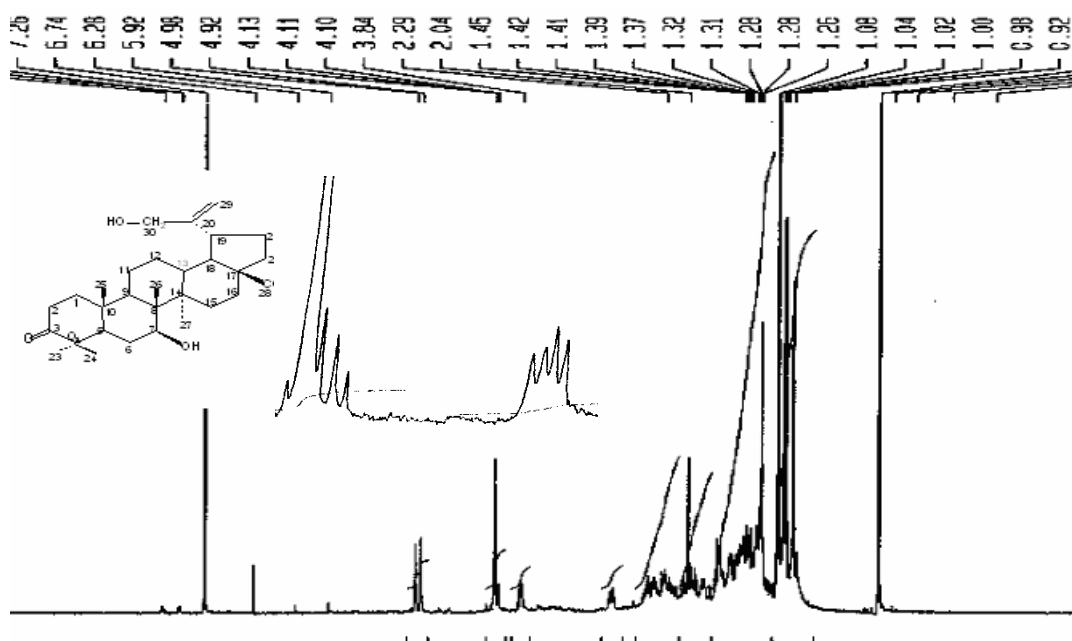


FIGURA 30: ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA 2 –  
ácido 3-oxo, 7 $\beta$ ,30-diidroxi-lup-20(29)-en-28-óico -  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz

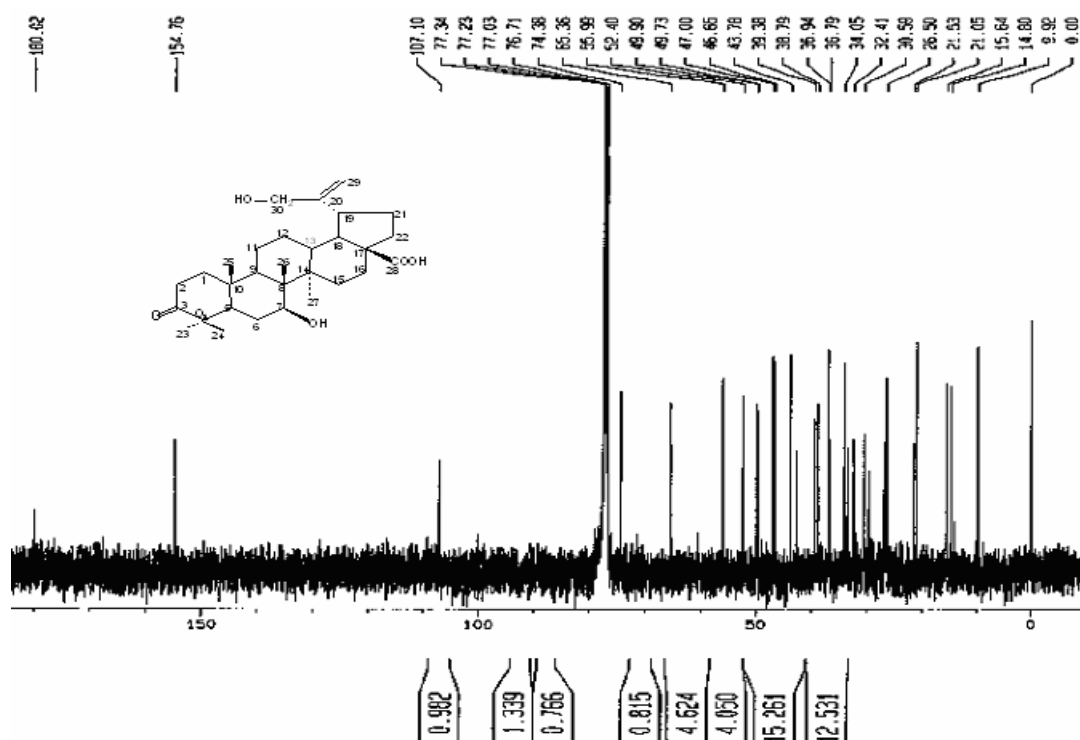


FIGURA 31: ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA 2 – ácido 3-oxo,7 $\beta$ ,30-diidroxi-lup-20(29)-en-28-óico -  $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz

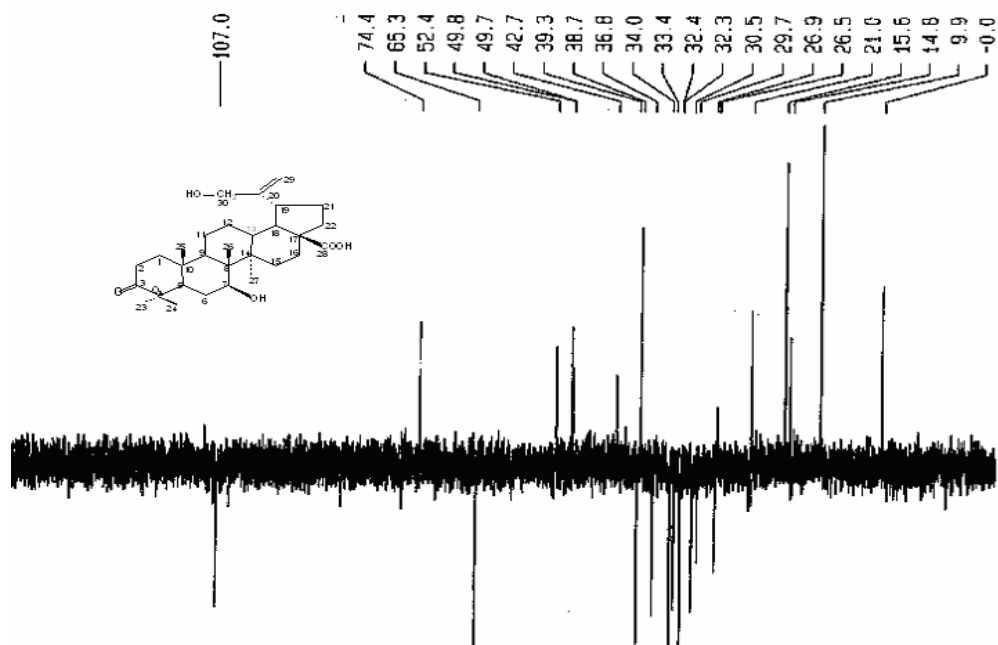


FIGURA 32: ESPECTRO DEPT DA SUBSTÂNCIA 2 – ácido 3-oxo, 7 $\beta$ ,30 -diidroxilup-20(29)-en-28-óico - CDCl<sub>3</sub>; 100MHz

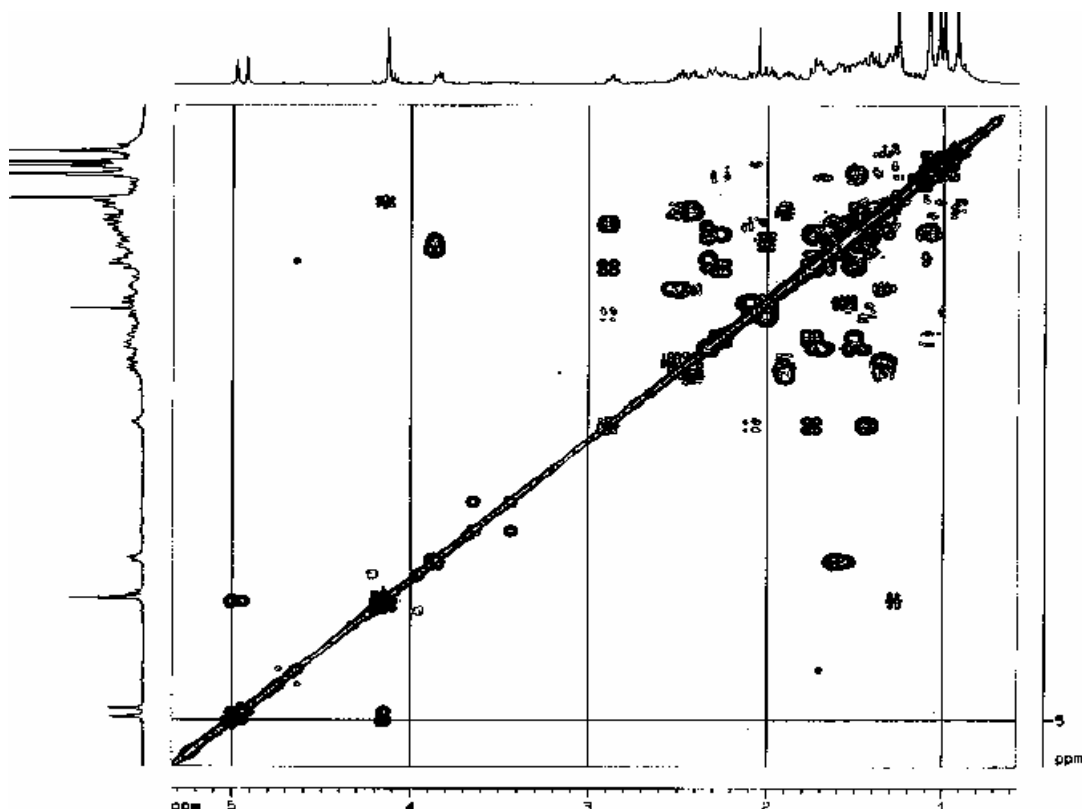


FIGURA 33: MAPA DE CONTORNO COSY DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA 2 – ácido 3-oxo, 7 $\beta$ ,30-diidroxi-lup-20(29)-en-28-óico -  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz

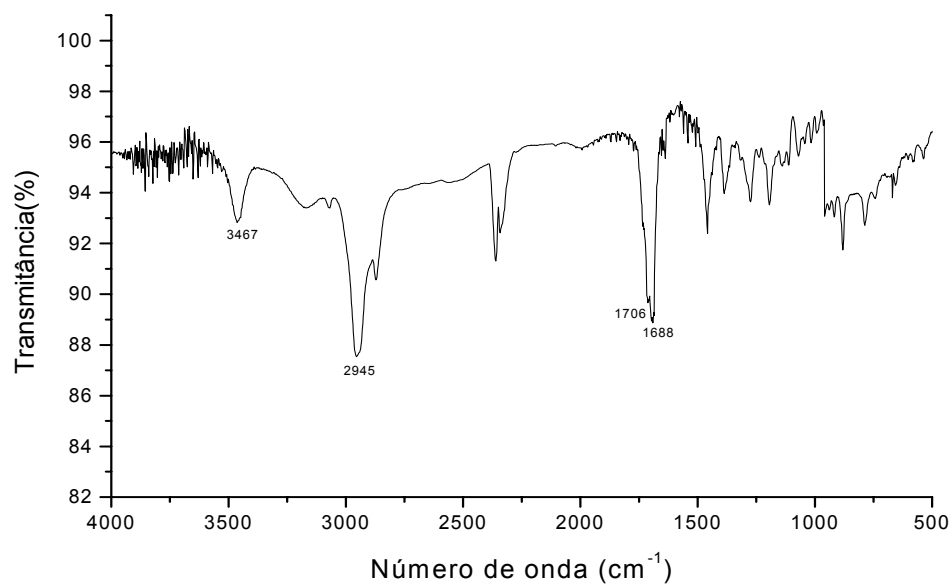


FIGURA 34: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DAS SUBSTÂNCIAS 3 E 11 - ácido 3-oxo, 7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diidroxi-lup-20(29)-en-28-óico

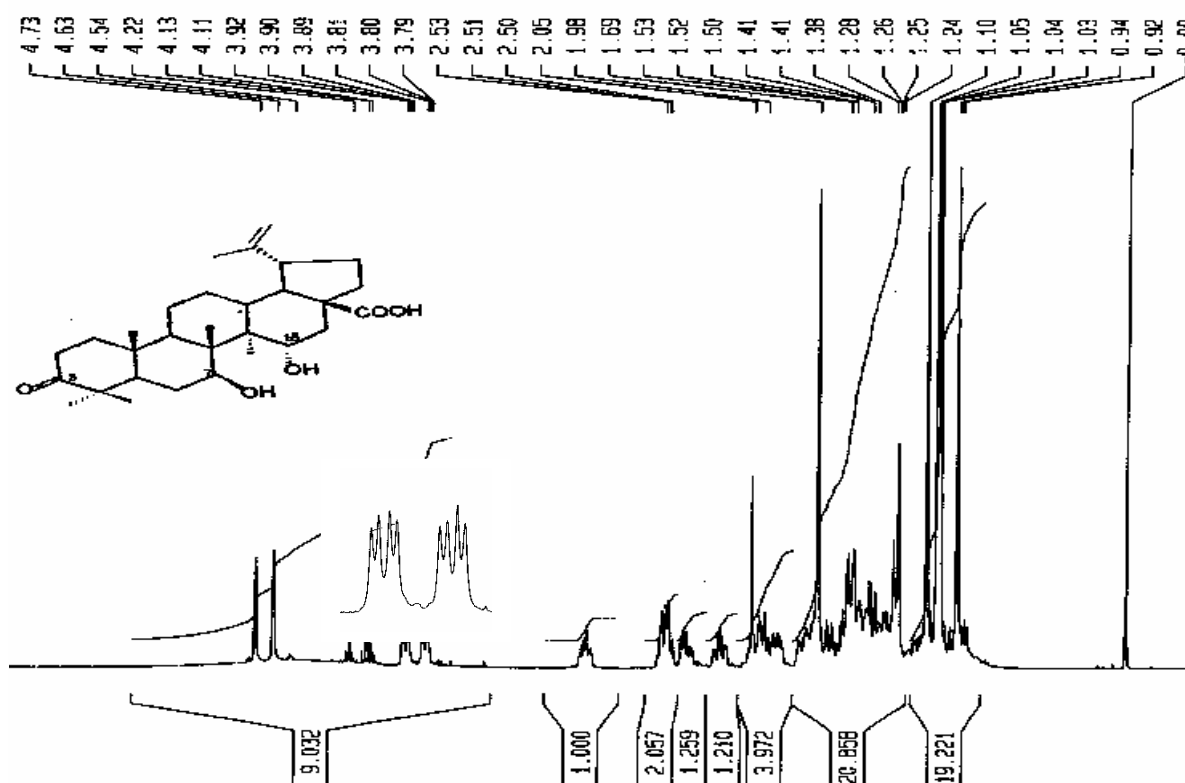


FIGURA 35: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup>H DAS SUBSTÂNCIAS 3 E 11 - ácido 3-oxo, 7 $\beta$ , 15 $\alpha$ -diidroxilup-20(29)-en-28-óico - CDCl<sub>3</sub>; 400MHz

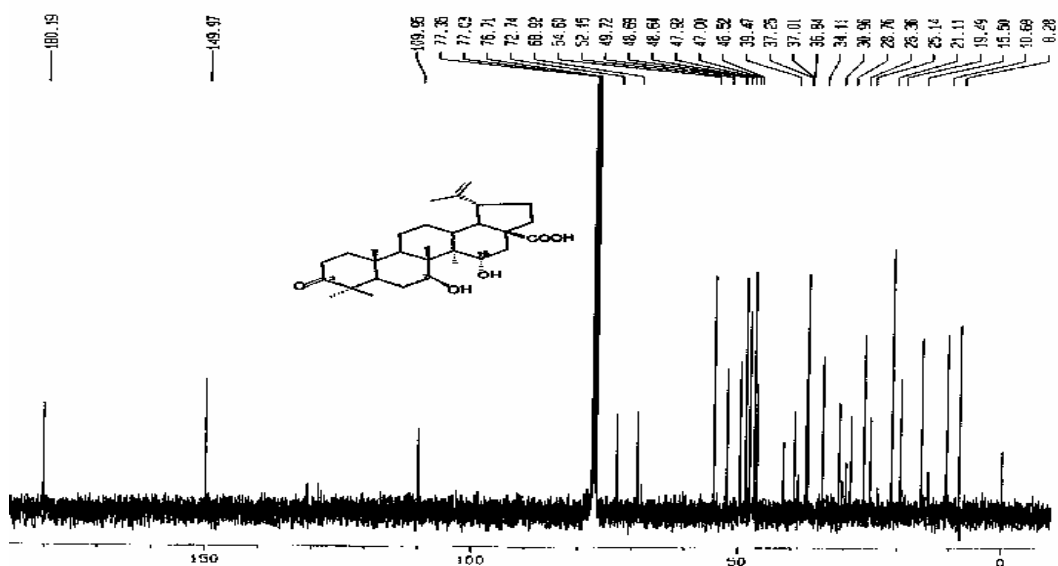


FIGURA 36: ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C DAS SUBSTÂNCIAS 3 E 11 - ácido 3-oxo, 7 $\beta$ , 15 $\alpha$ -diidroxilup-20(29)-en-28-óico - CDCl<sub>3</sub>; 100MHz

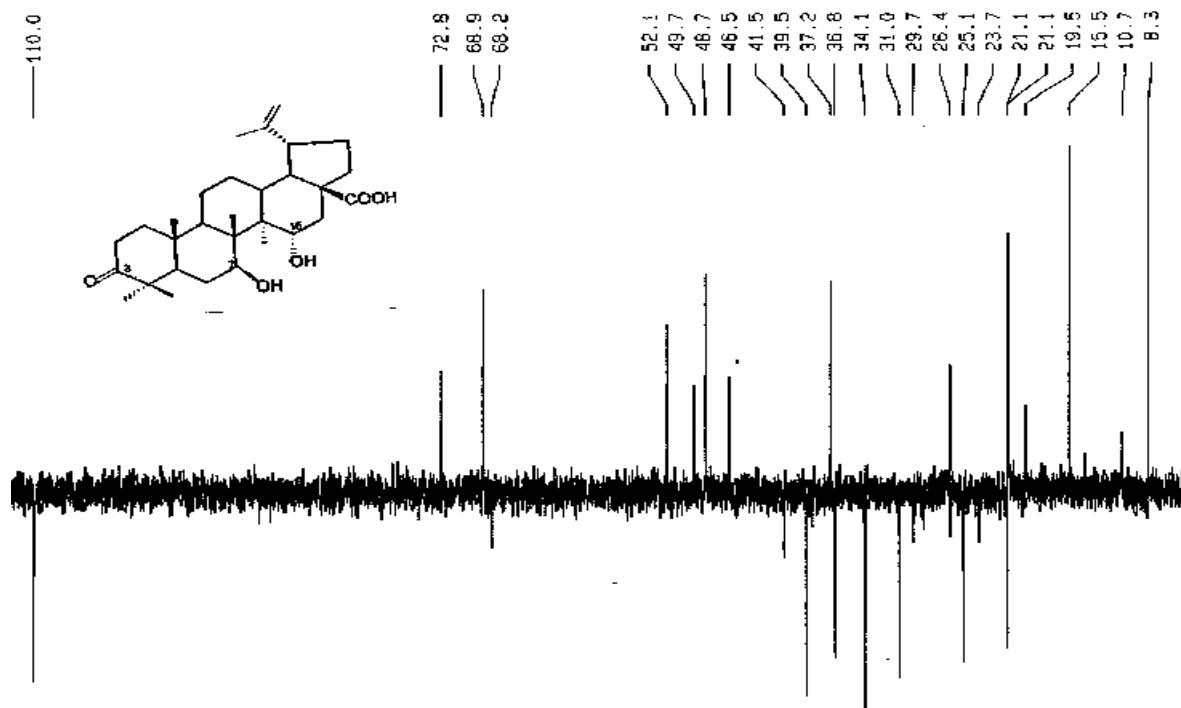


FIGURA 37: ESPECTRO DEPT DAS SUBSTÂNCIAS 3 E 11 –  
ácido 3-oxo, 7β,15α-diidroxi-lup-20(29)-en-28-óico - CDCl<sub>3</sub>; 100MHz

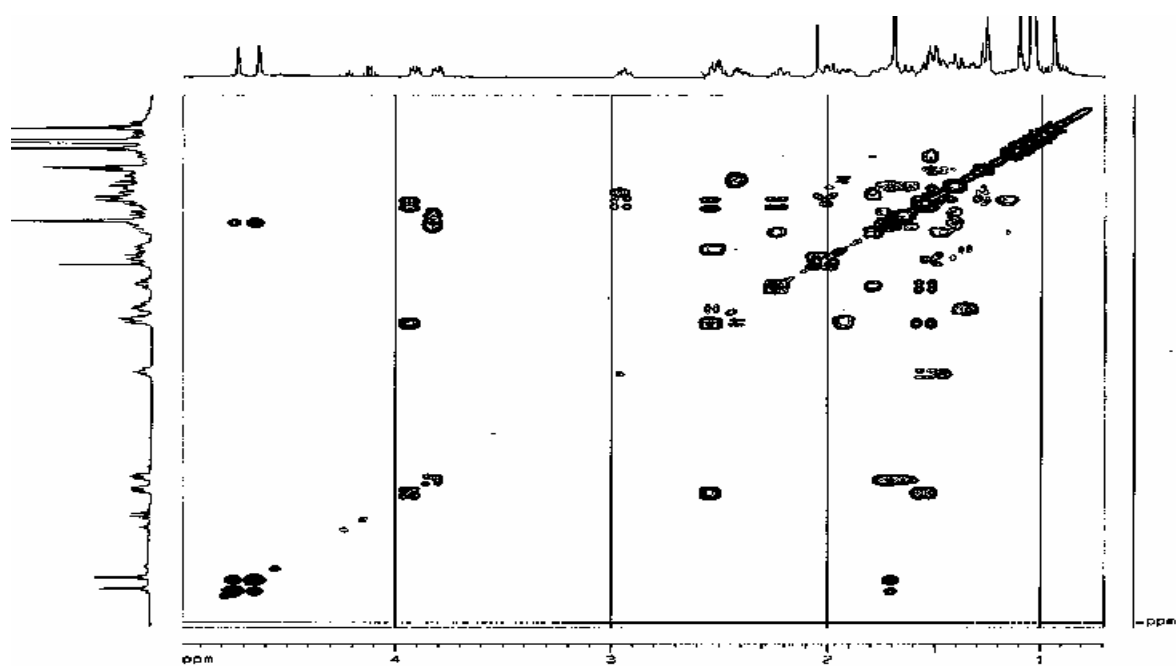


FIGURA 38: MAPA DE CONTOURO COSY DE <sup>1</sup>H DAS SUBSTÂNCIAS 3 E 11 –  
ácido 3-oxo, 7β,15α-diidroxi-lup-20(29)-en-28-óico - CDCl<sub>3</sub>; 400MHz

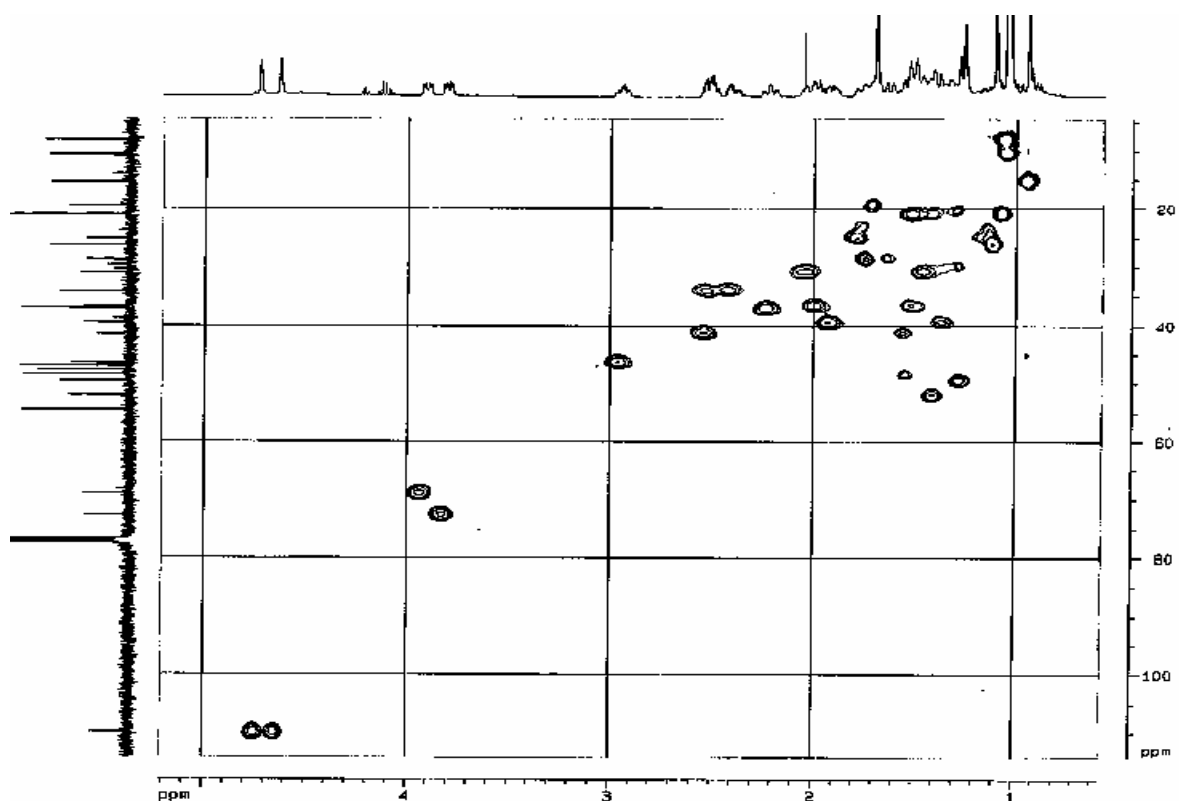


FIGURA 39: MAPA DE CONTORNO HMQC DAS SUBSTÂNCIAS 3 E 11 – ácido 3-oxo, 7 $\beta$ ,15 $\alpha$ -diidroxilup-20(29)-en-28-óico - CDCl<sub>3</sub>; 400MHz

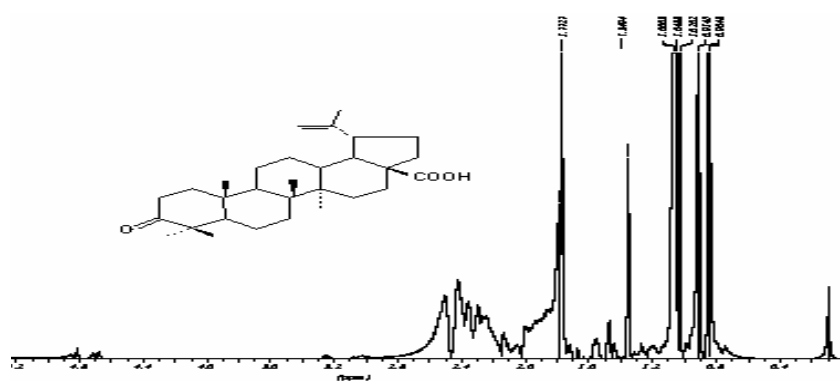


FIGURA 40: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup>H DAS SUBSTÂNCIAS 4 E 12 – ácido betulônico - CDCl<sub>3</sub>; 200MHz

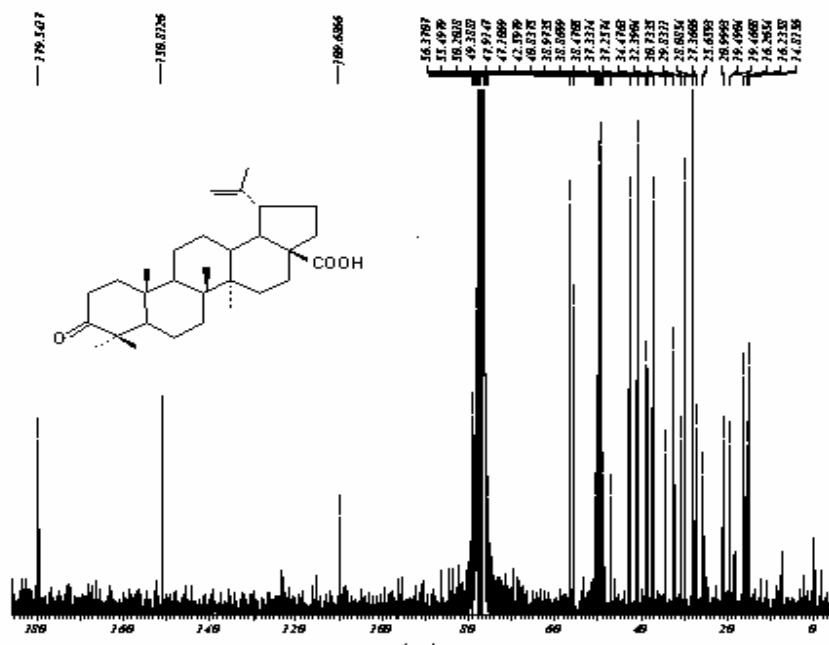


FIGURA 41: ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS SUBSTÂNCIAS 4 E 12 – ácido betulônico -  $\text{CDCl}_3$ ; 50MHz

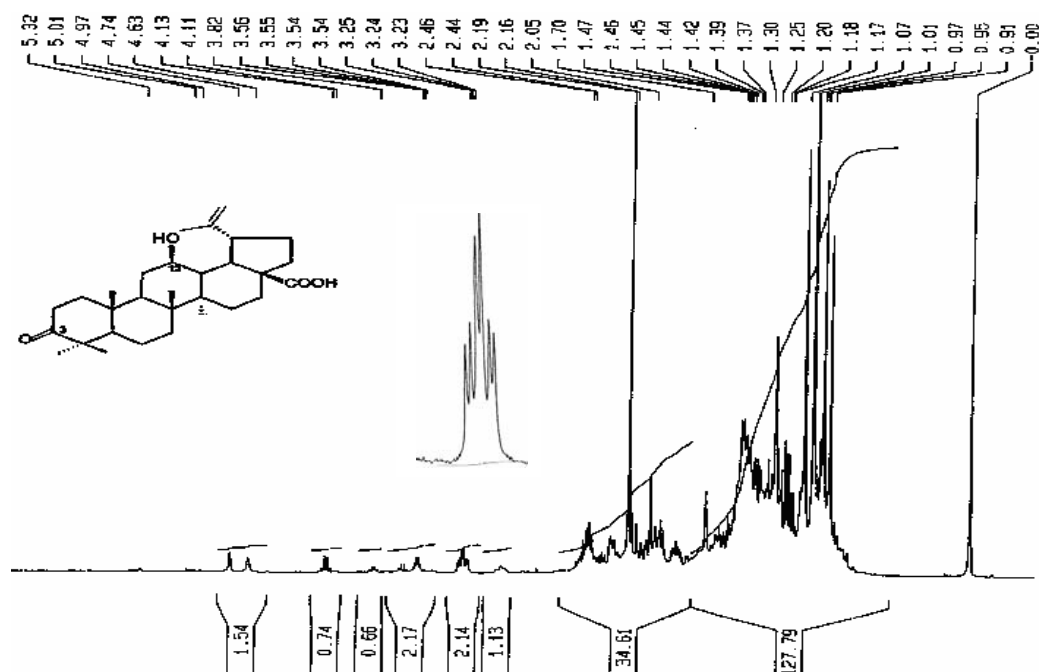


FIGURA 42: ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA 6 – ácido 3-oxo,12β-hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico –  $\text{CDCl}_3$ ; 400MHz

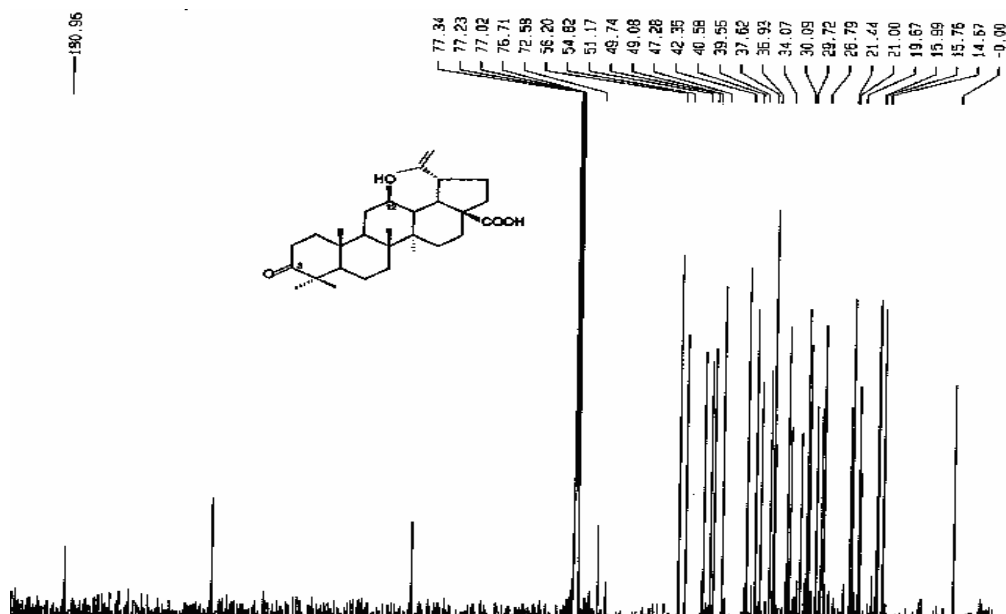


FIGURA 43: ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA 6 – ácido 3-oxo,12  $\beta$  hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico –  $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz

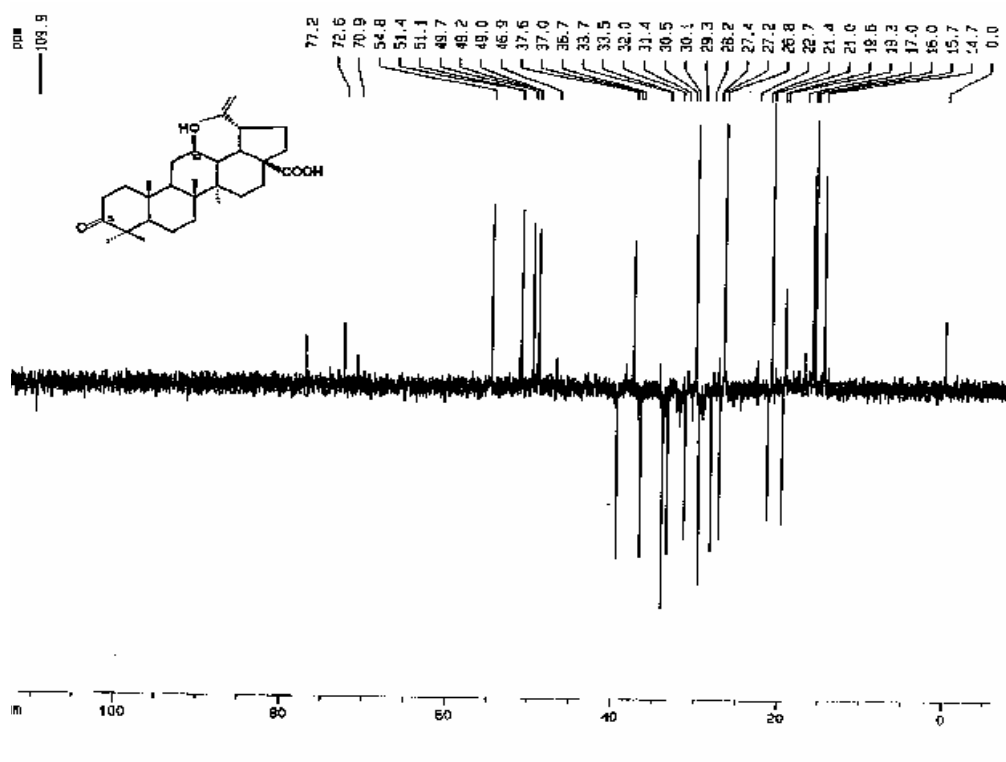


FIGURA 44: ESPECTRO DE DEPT DA SUBSTÂNCIA 6 – ácido 3-oxo,12 $\beta$  hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico –  $\text{CDCl}_3$ ; 100MHz



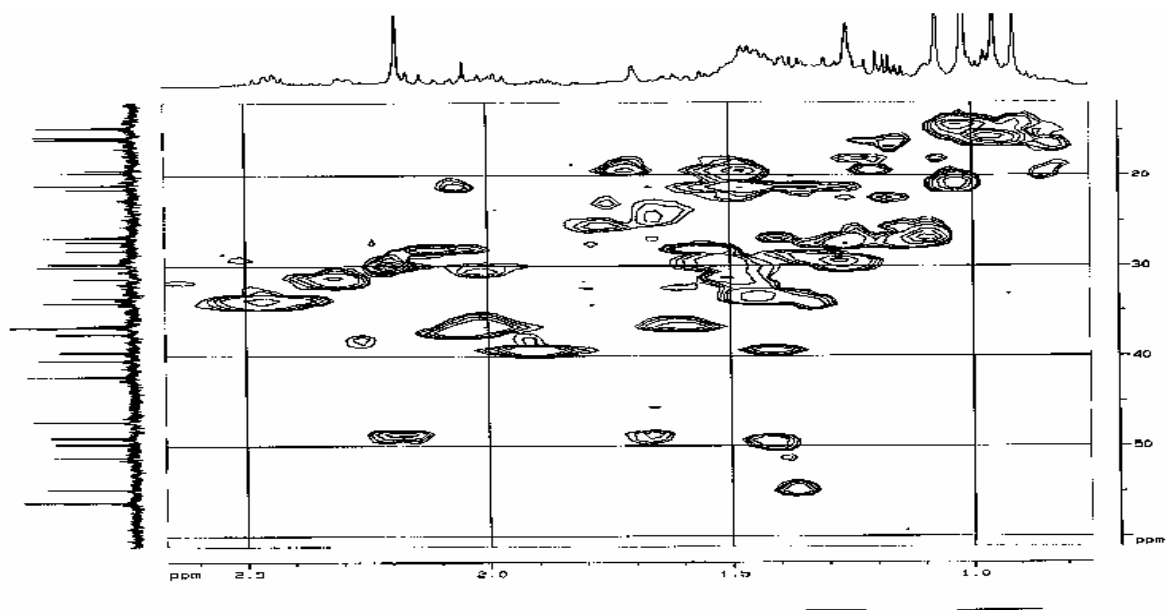


FIGURA 45: MAPA DE CONTORNO HMBC DA SUBSTÂNCIA 6 – ácido 3-oxo, 12β hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico – CDCl<sub>3</sub>; 400MHz

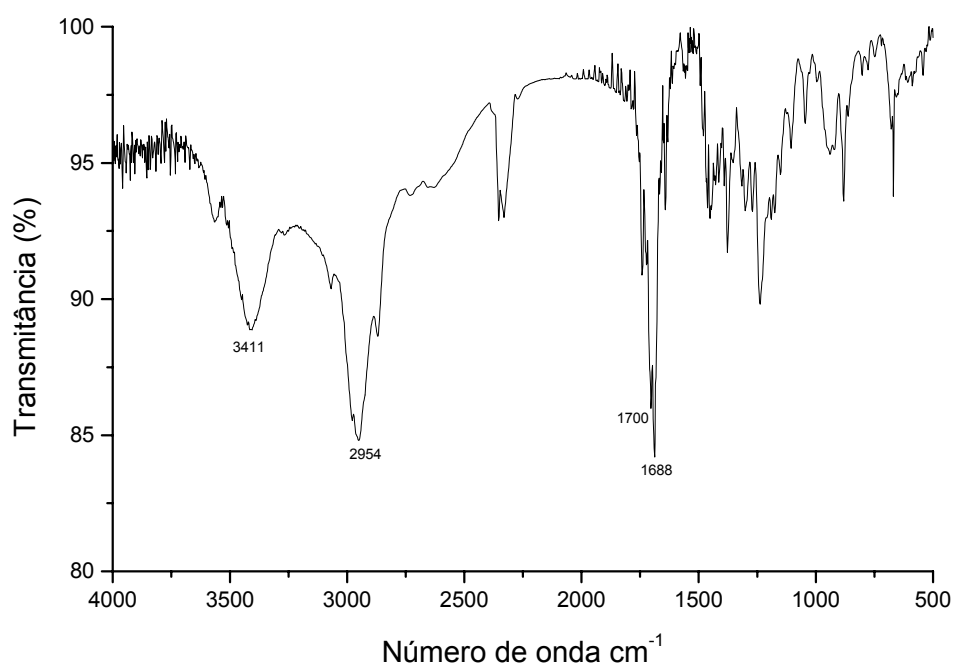


FIGURA 46: ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA SUBSTÂNCIA 7 - ácido 3-oxo, 25 hidroxi-lup-20(29)en-28-óico

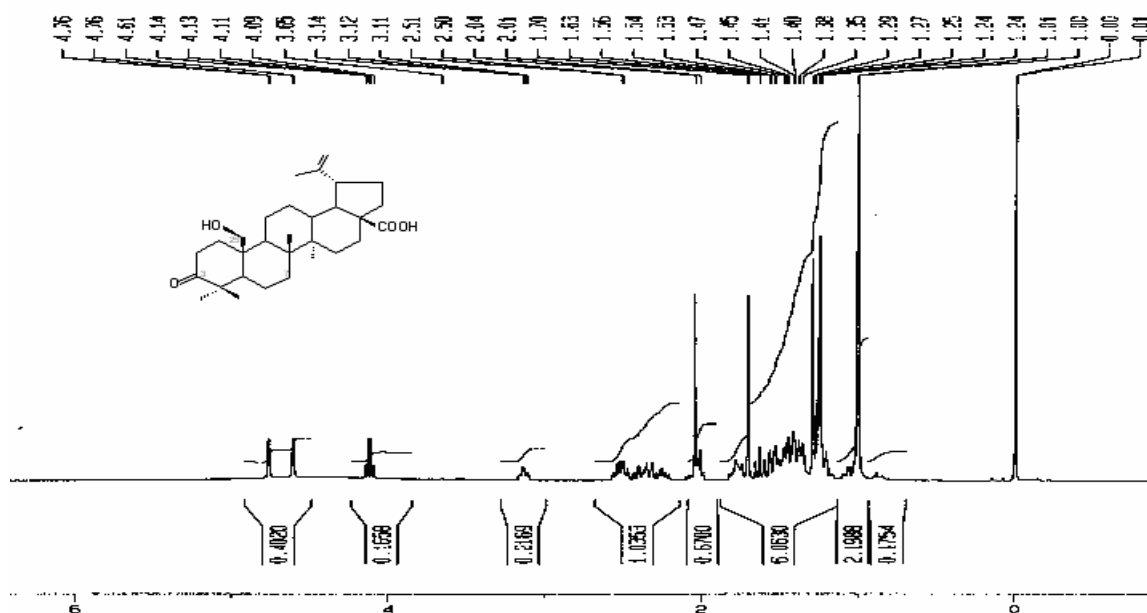


FIGURA 47: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup>H DA SUBSTÂNCIA 7 - ácido 3-oxo, 25 hidroxi-lup-20(29)en-28-óico – CDCl<sub>3</sub>, gts. pyd; 400MHz

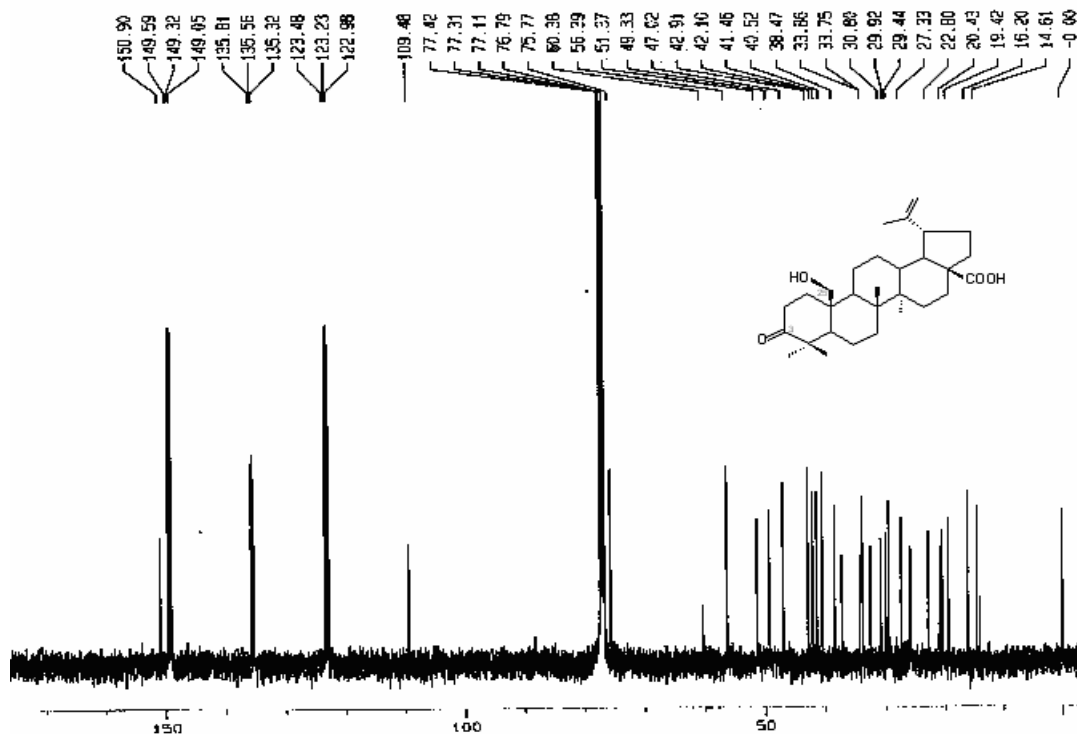


FIGURA 48: ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C DA SUBSTÂNCIA 7 - ácido 3-oxo, 25 hidroxi-lup-20(29)en-28-óico – CDCl<sub>3</sub>, gts. pyd; 100MHz

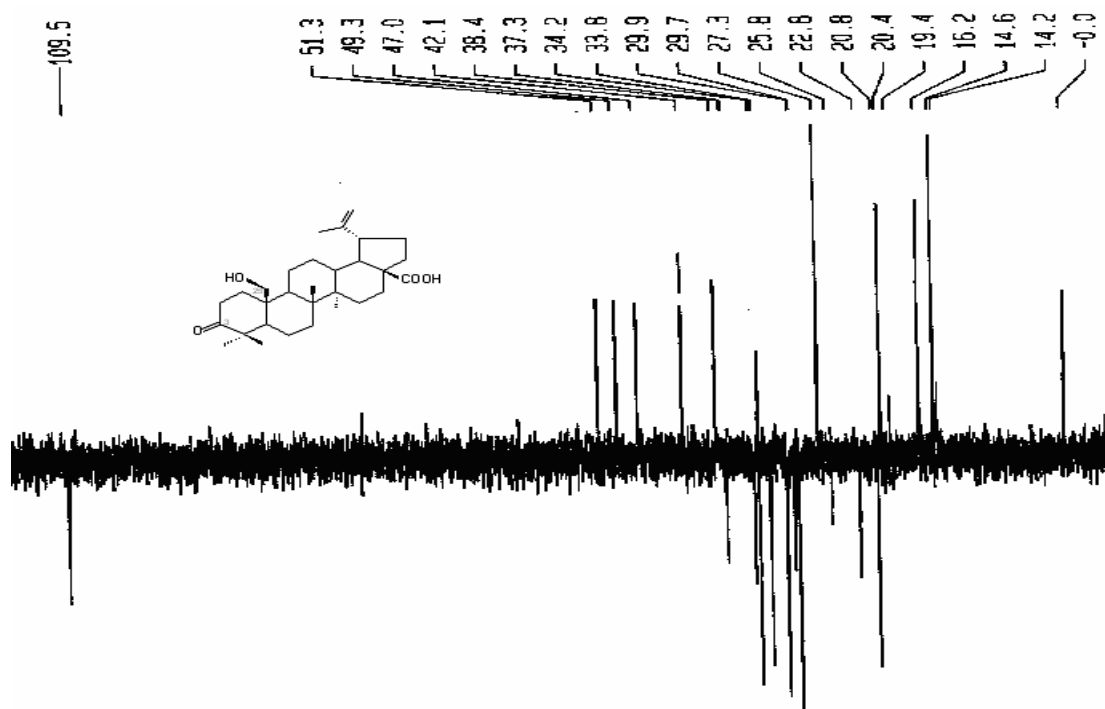


FIGURA 49: ESPECTRO DE DEPT DA SUBSTÂNCIA 7 - ácido 3-oxo, 25 hidroxi-lup-20(29)en-28-óico –  $\text{CDCl}_3$ , gts. pyd; 100MHz

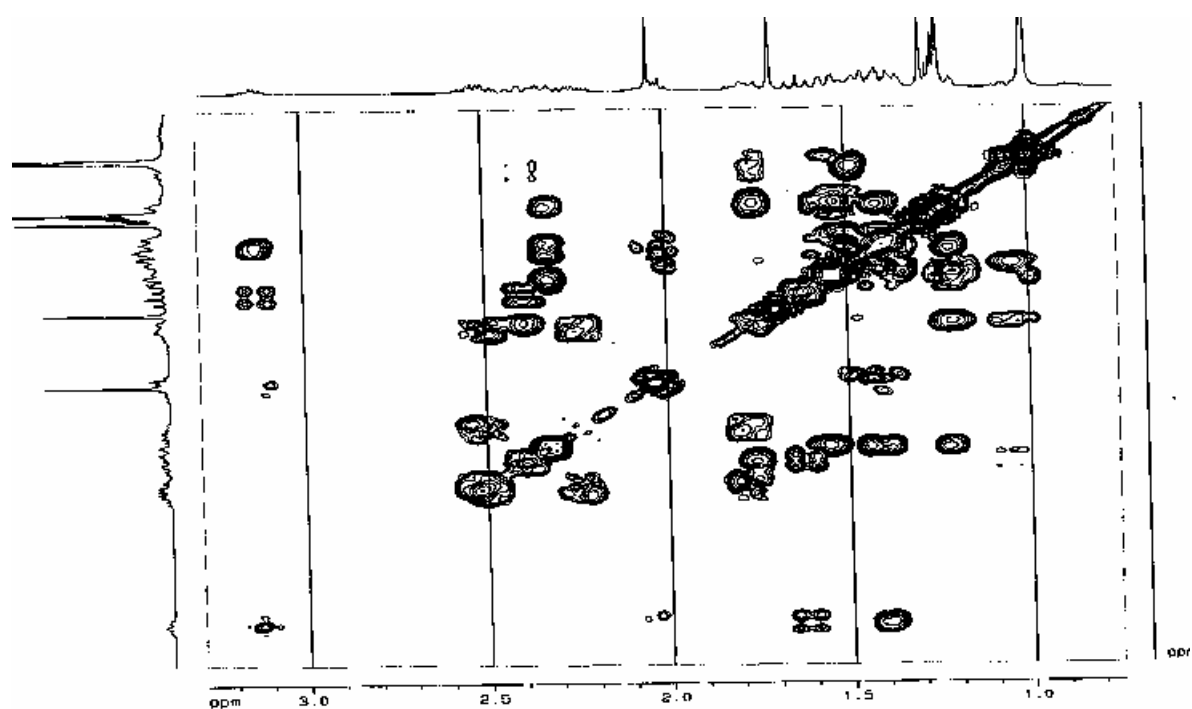


FIGURA 50: MAPA DE CONTORNO COSY DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA 7 - ácido 3-oxo, 25 hidroxi-lup-20(29)en-28-óico –  $\text{CDCl}_3$ , gts.pyd.; 400MHz

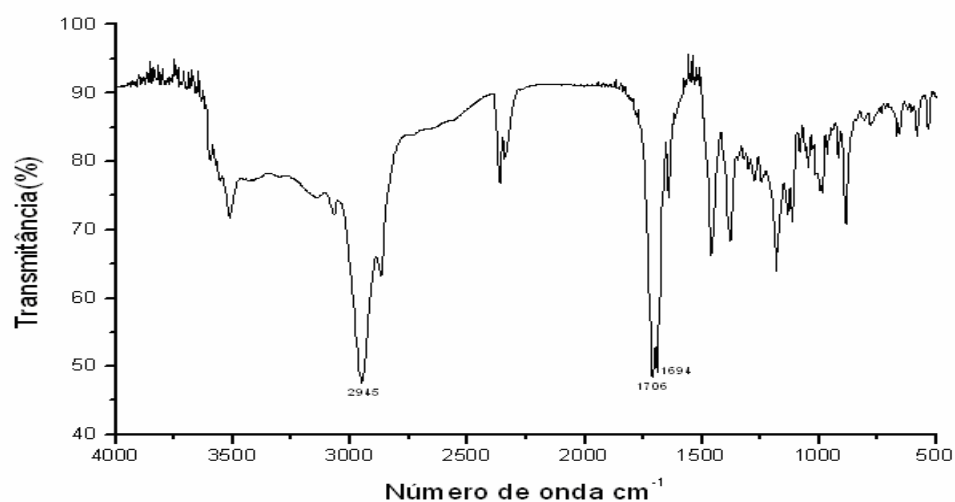


FIGURA 51: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS SUSBTÂNCIAS 9 e 10 - ácido 3-oxo,15 $\alpha$  -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico

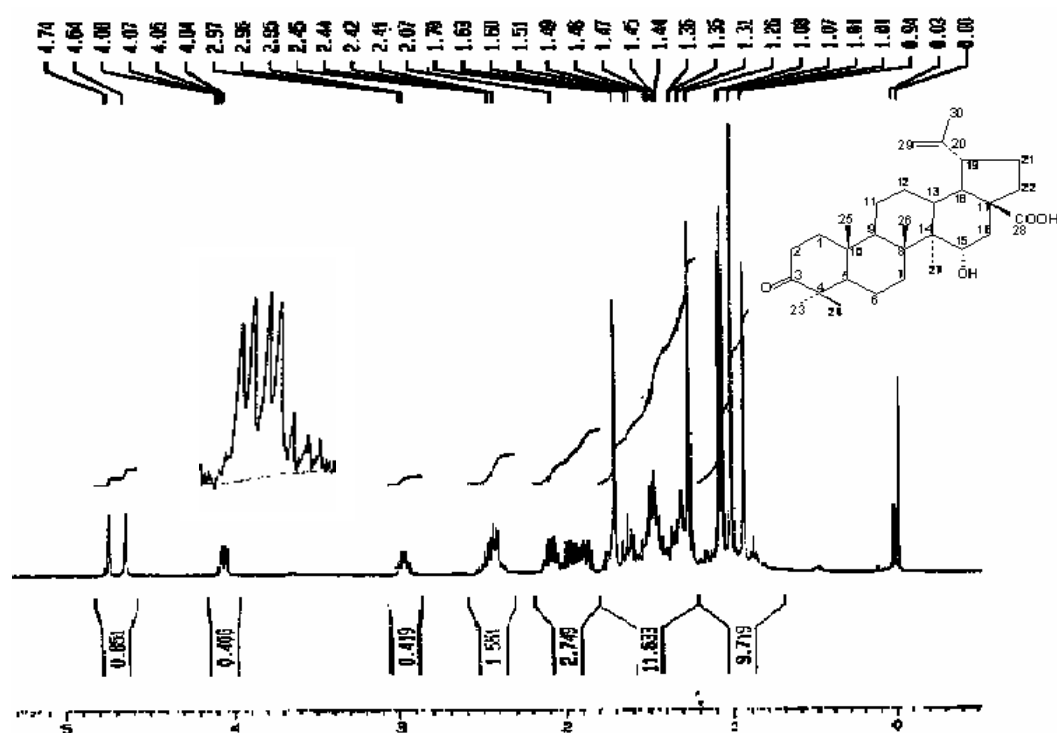


FIGURA 52 : ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DAS SUBSTÂNCIAS 9 E 10 – ácido 3-oxo,15 $\alpha$  -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico -  $\text{CDCl}_3$ ; 400MHz

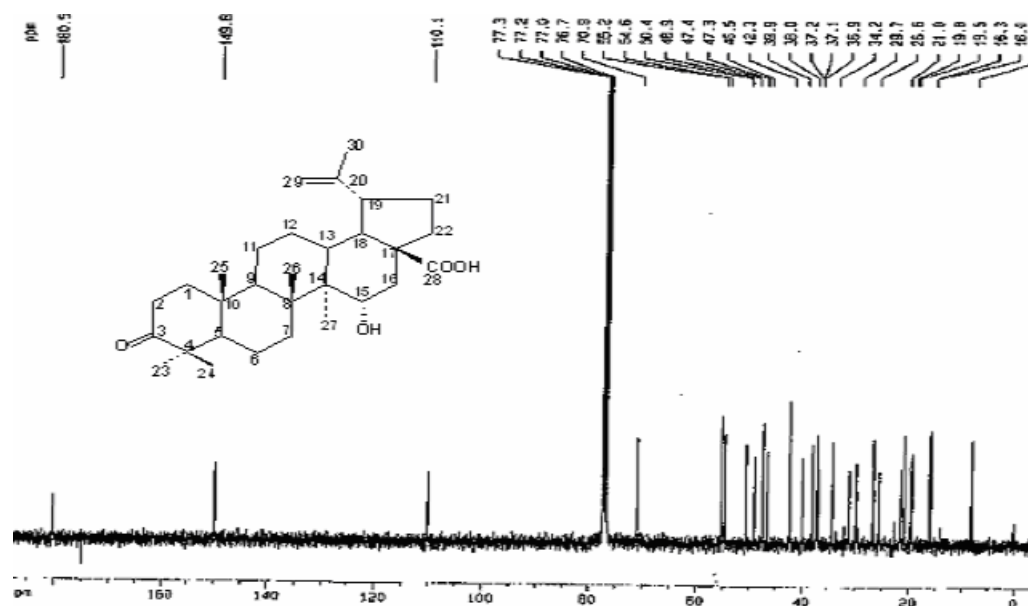


FIGURA 53: ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C DAS SUBSTÂNCIAS 9 E 10 – ácido 3-oxo,15α -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico - CDCl<sub>3</sub>; 100MHz

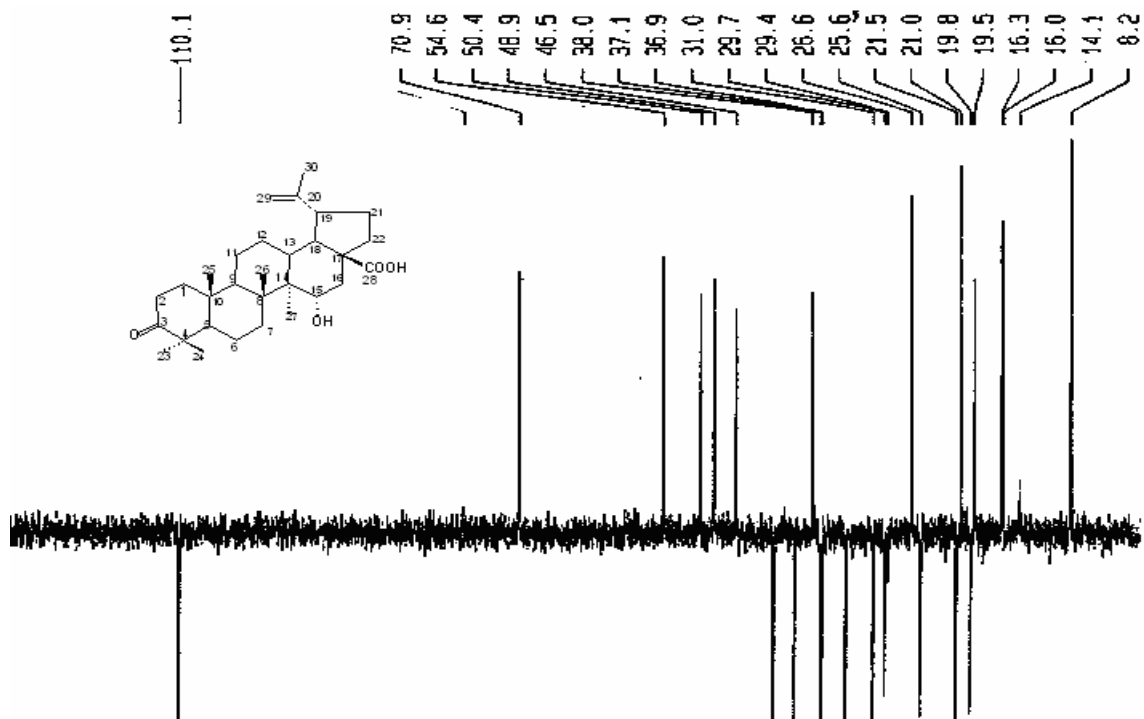


FIGURA 54: ESPECTRO DE DEPT DAS SUBSTÂNCIAS 9 E 10 – ácido 3-oxo,15α -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico - CDCl<sub>3</sub>; 100MHz

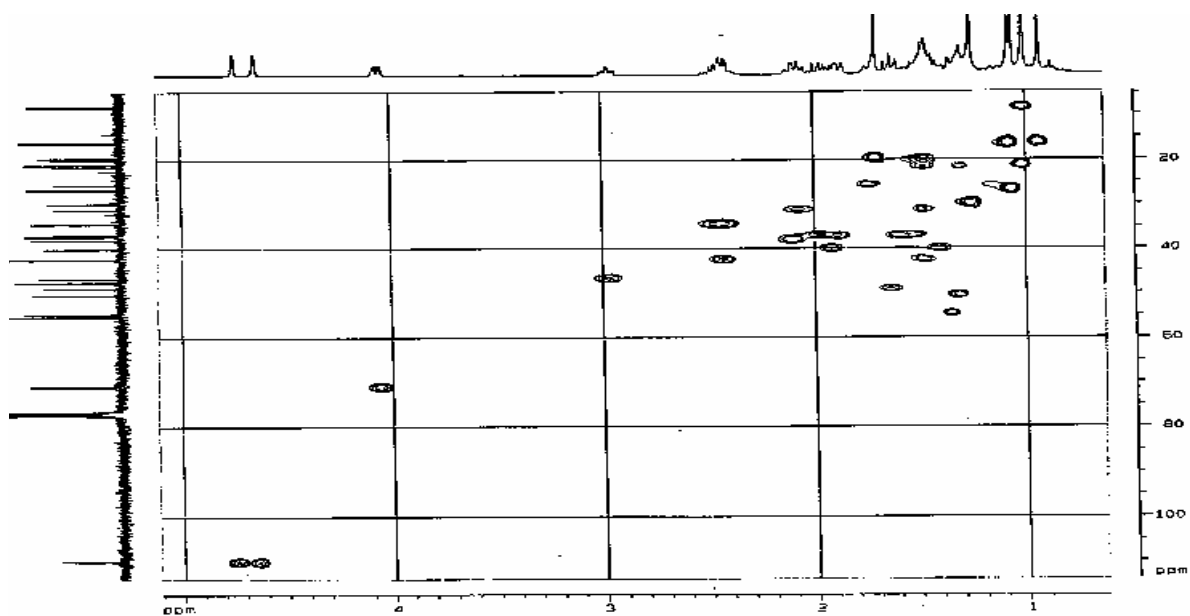


FIGURA 55: MAPA DE CONTORNO HMBC DAS SUBSTÂNCIAS 9 E 10 –  
ácido 3-oxo,15 $\alpha$ -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico - CDCl<sub>3</sub>; 400MHz

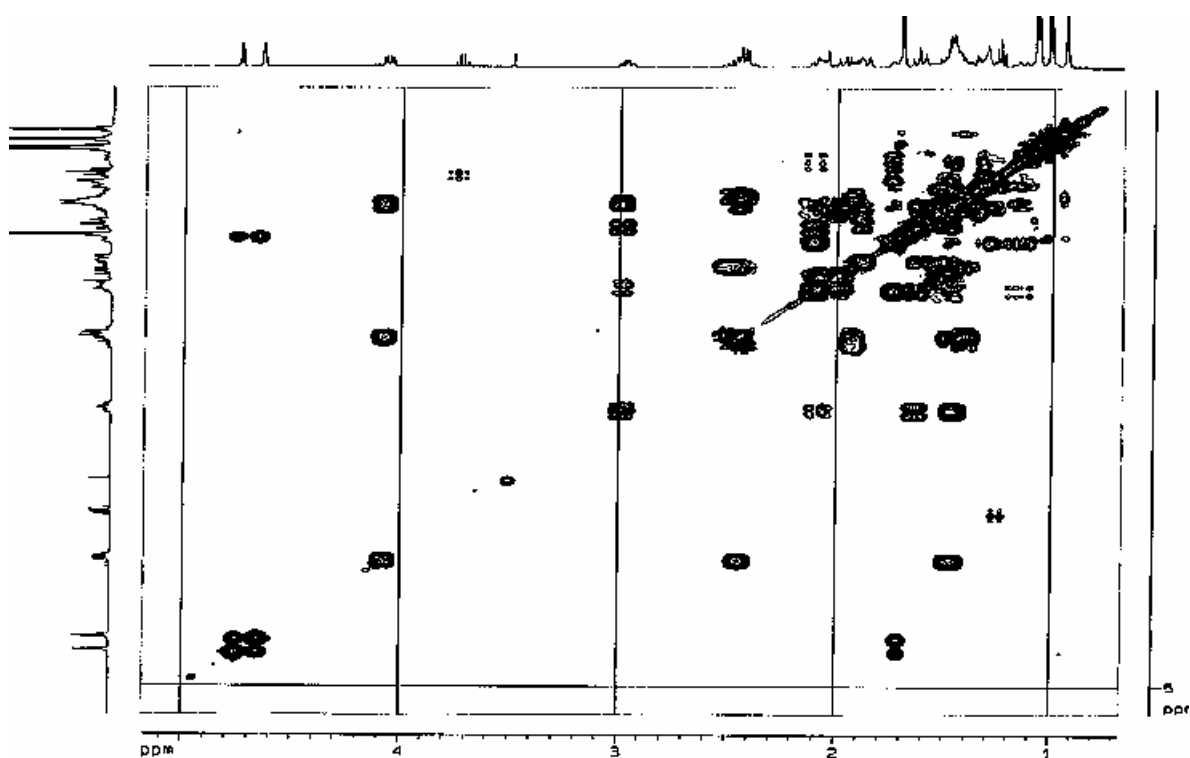


FIGURA 56: MAPA DE CONTORNO COSY DE <sup>1</sup>H DAS SUSBTÂNCIAS 9 E 10 –  
ácido 3-oxo, 15 $\alpha$ -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico - CDCl<sub>3</sub>; 400MHz

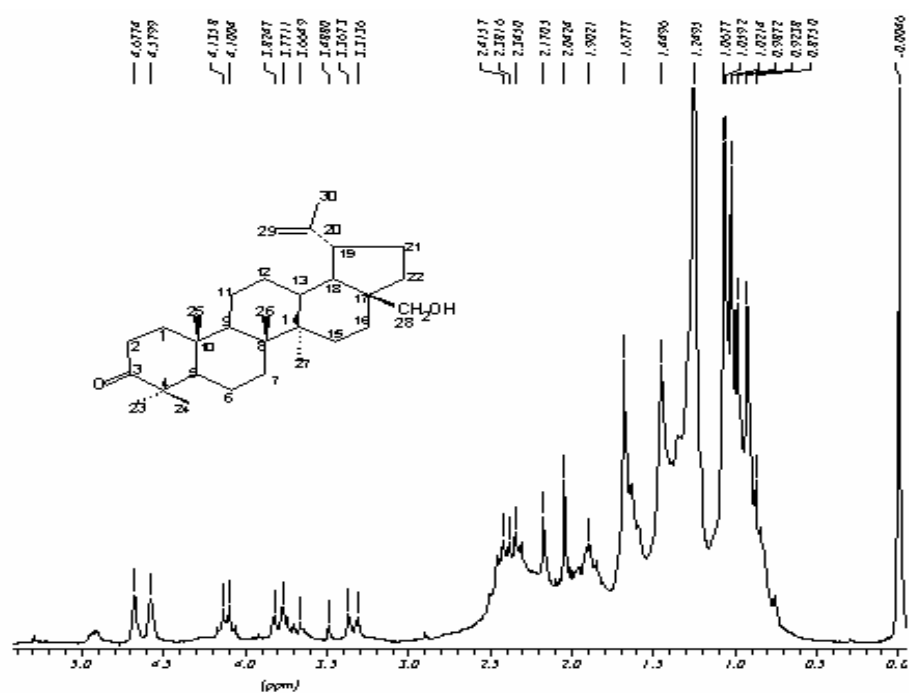


FIGURA 57: ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUSBTÂNCIA 8 – 3-oxolup-20(29)-en-28-ol –  $\text{CDCl}_3$ ; 200 MHz

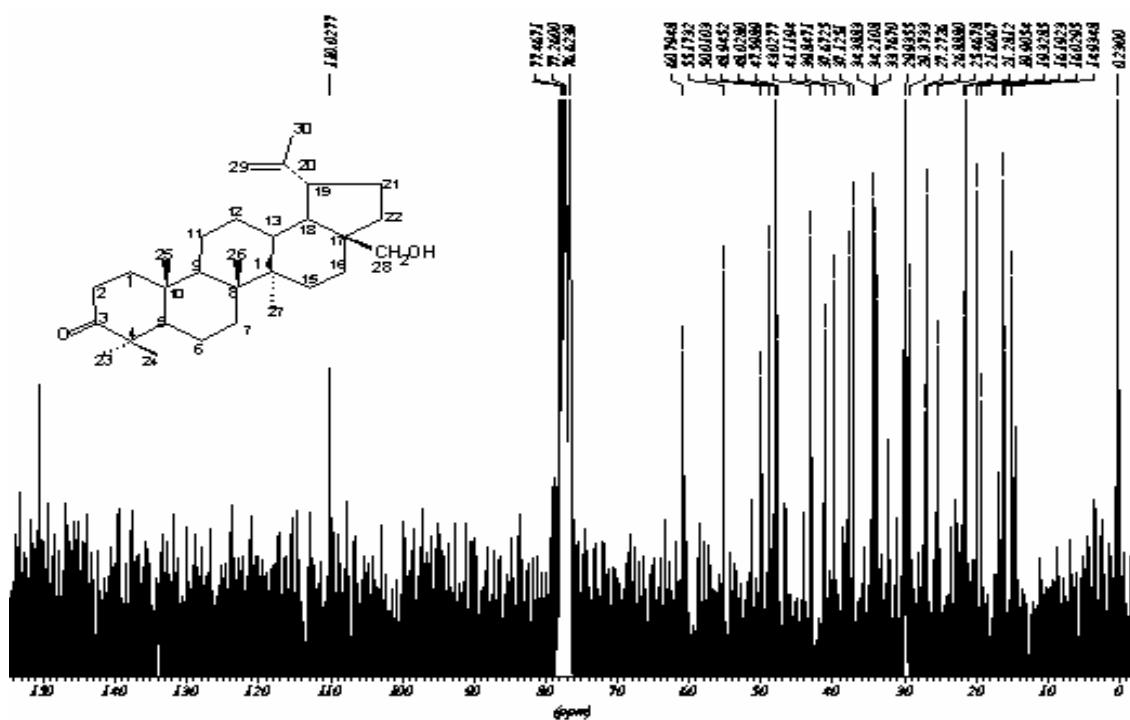


FIGURA 58: ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUSBTÂNCIA 8 – 3-oxolup-20(29)-en-28-ol –  $\text{CDCl}_3$ ; 50 MHz

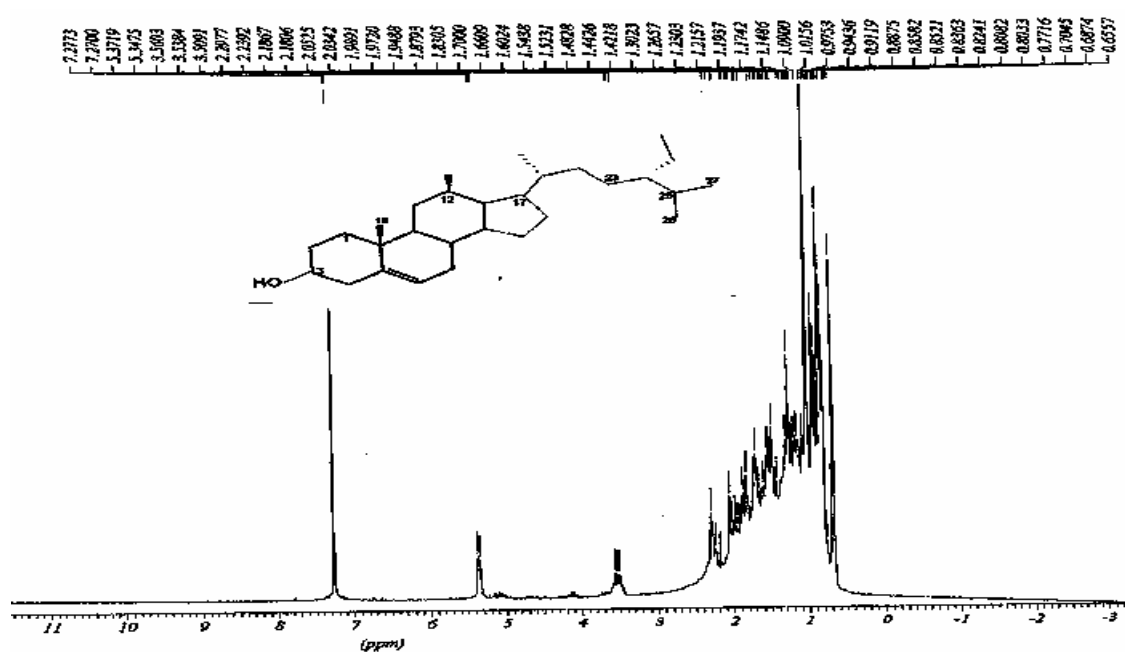


FIGURA 59: ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUSBTÂNCIA EP-1 –  $\beta$ -sistosterol -  $\text{CDCl}_3$ ; 200MHz

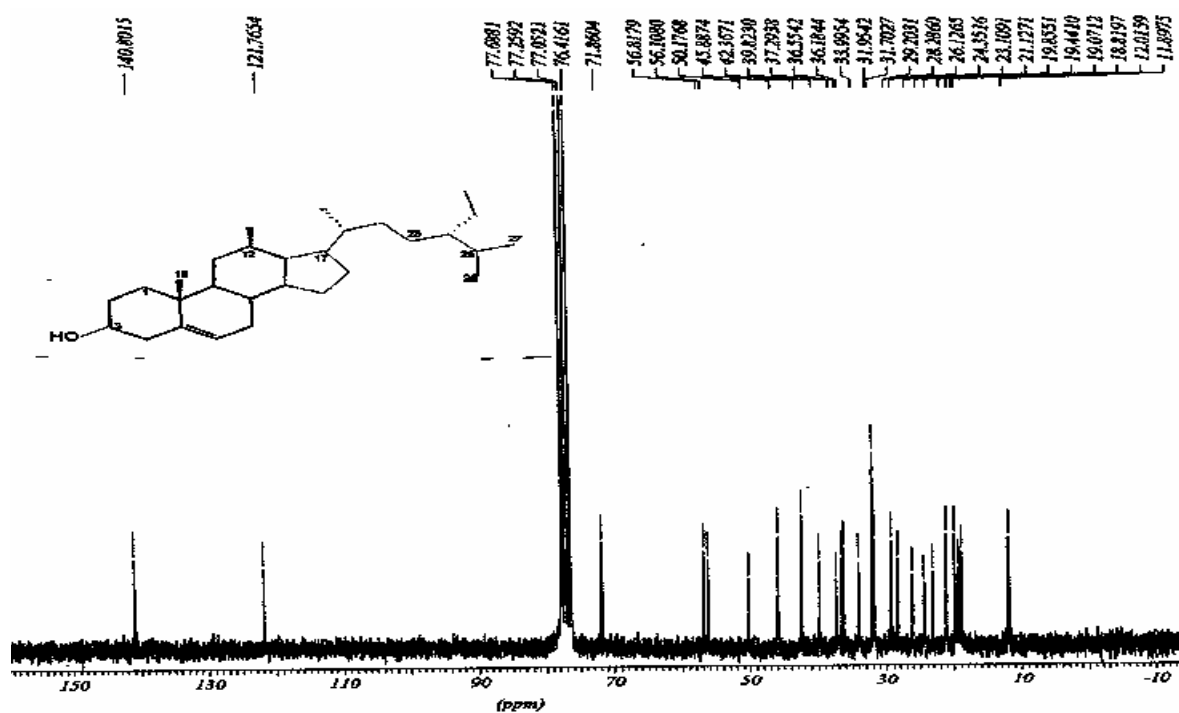


FIGURA 60: ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA EP-1 –  $\beta$ -sistosterol -  $\text{CDCl}_3$ ; 50MHz



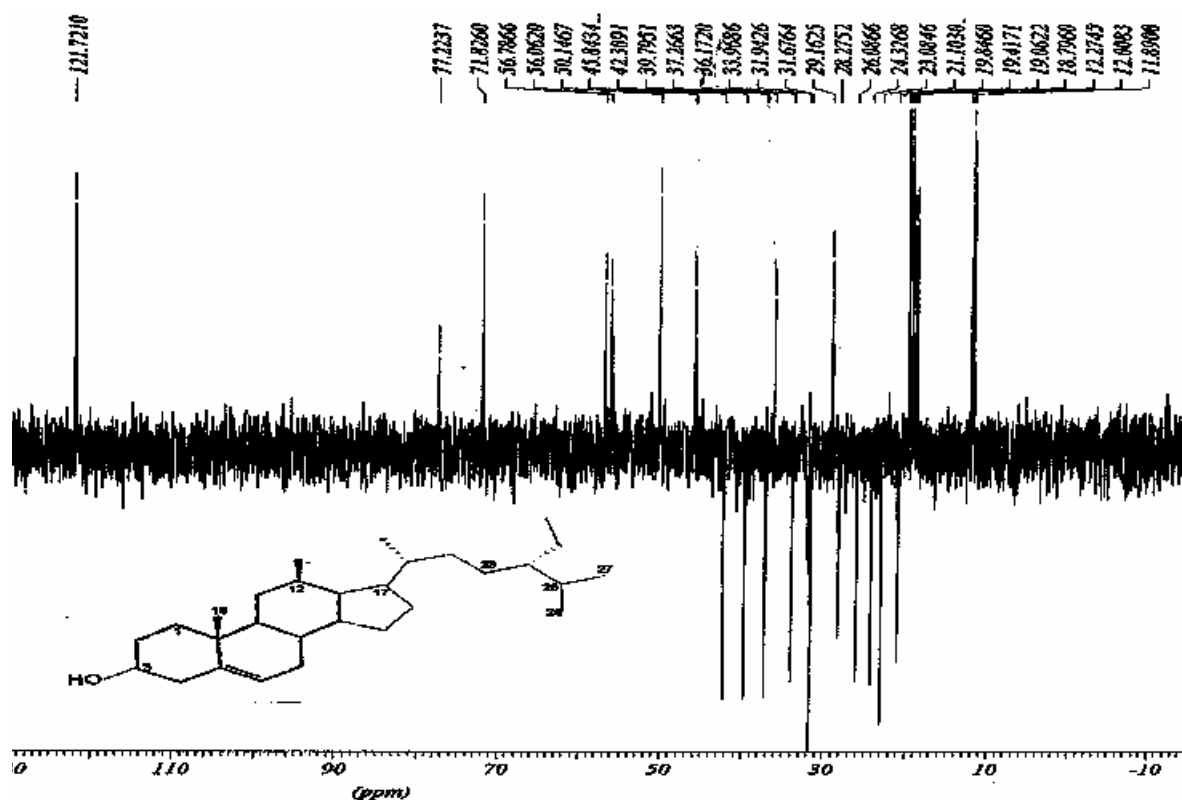


FIGURA 61: ESPECTRO DE DEPT DA SUBSTÂNCIA EP-1 –  $\beta$ -sistosterol -  $\text{CDCl}_3$ ; 50MHz

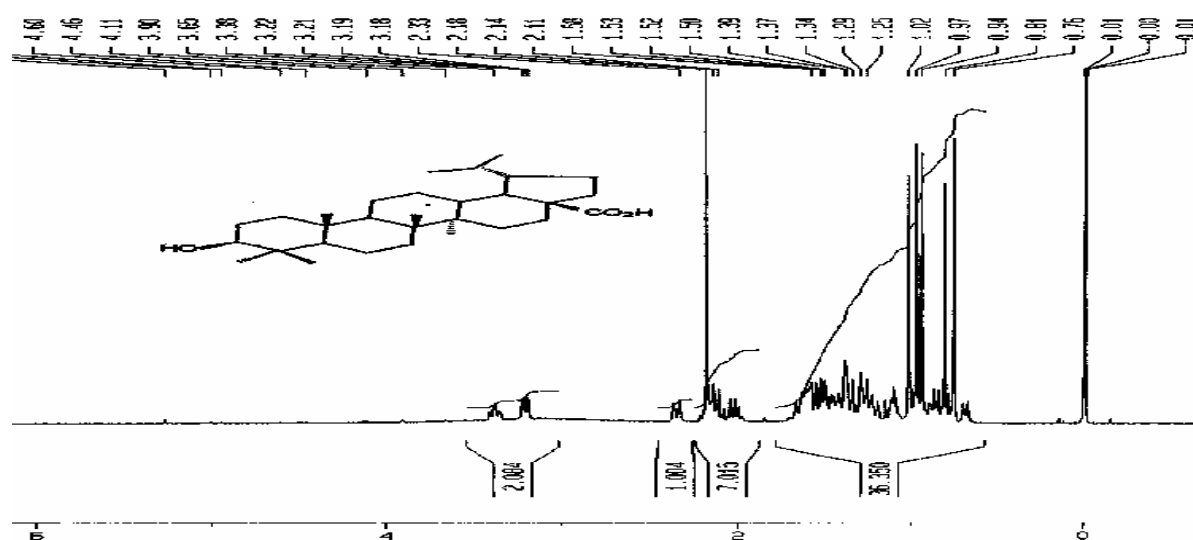


FIGURA 62: ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA EP-2 – ácido diidrobetulínico -  $\text{CDCl}_3$ , grs. Pyd.; 400MHz

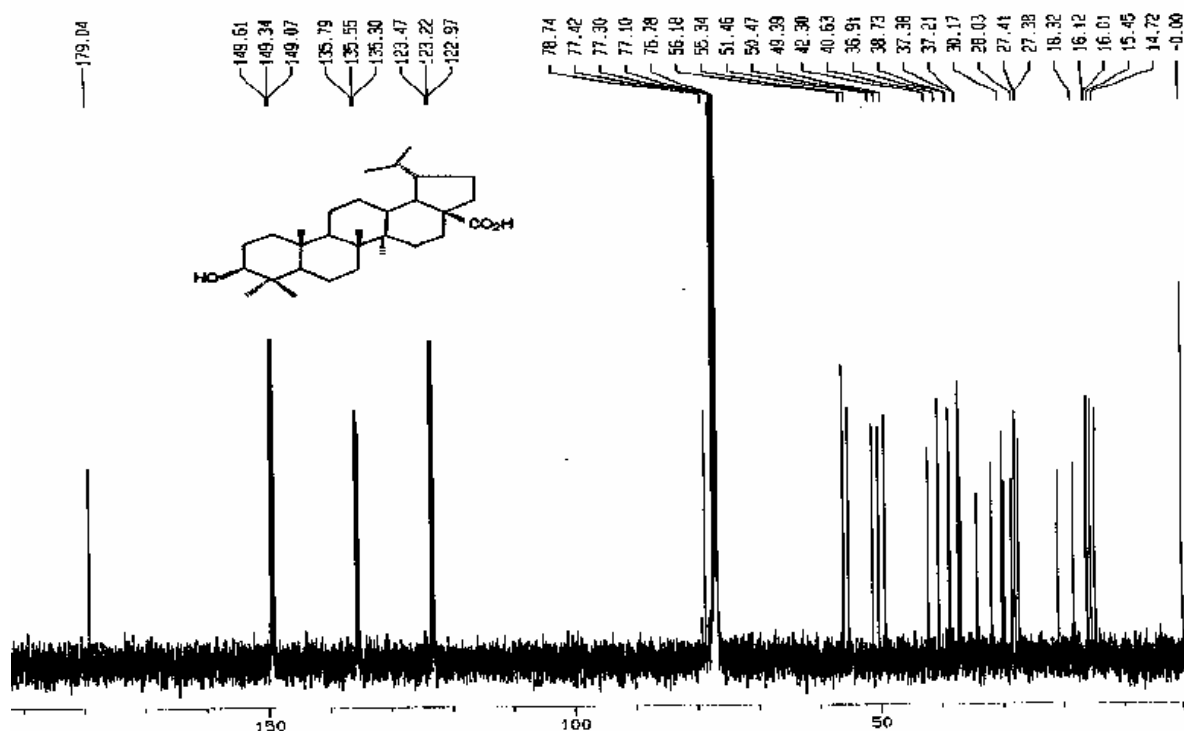


FIGURA 63: ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA EP-2 – ácido diidrobetulínico -  $\text{CDCl}_3$ , gts. pyd.; 100MHz

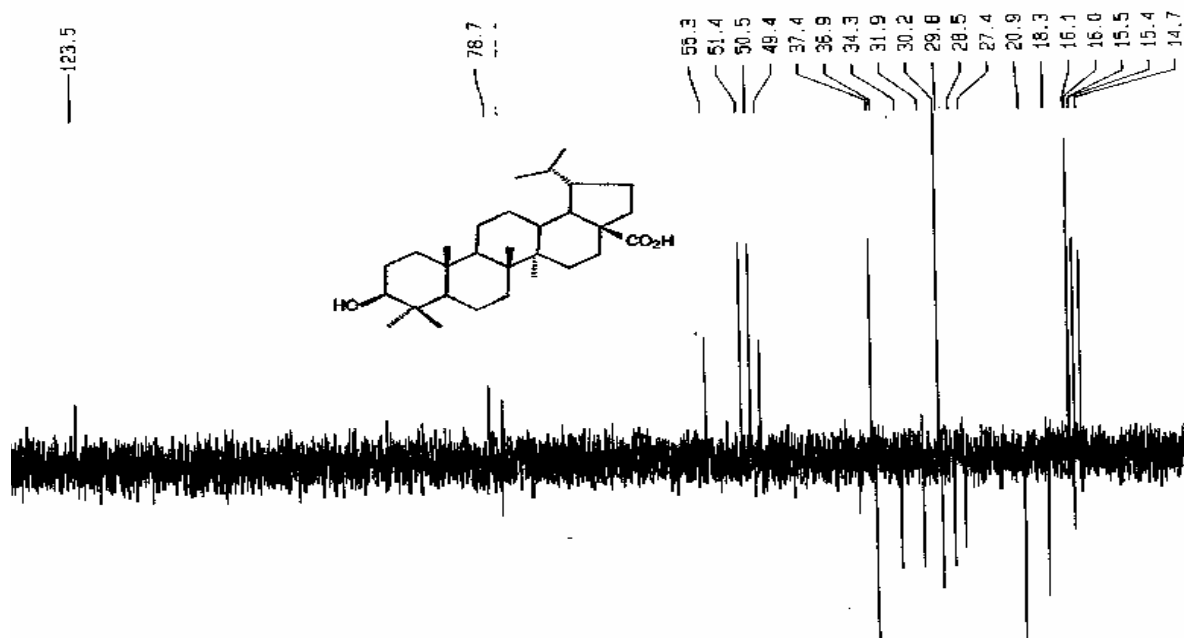


FIGURA 64: ESPECTRO DE DEPT DA SUBSTÂNCIA EP-2 – ácido diidrobetulínico -  $\text{CDCl}_3$ , gts. pyd.; 100MHz

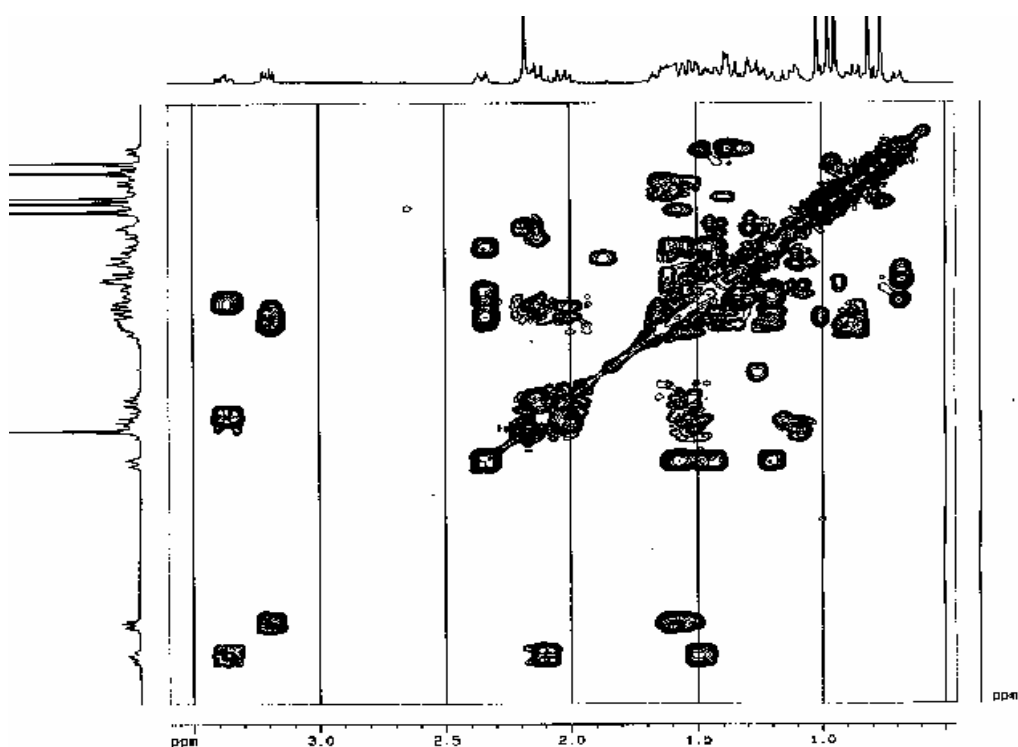


FIGURA 65: MAPA DE CONTORNO COSY  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA EP-2 – ácido diidrobetulínic -  $\text{CDCl}_3$ , gts. pyd.; 400MHz

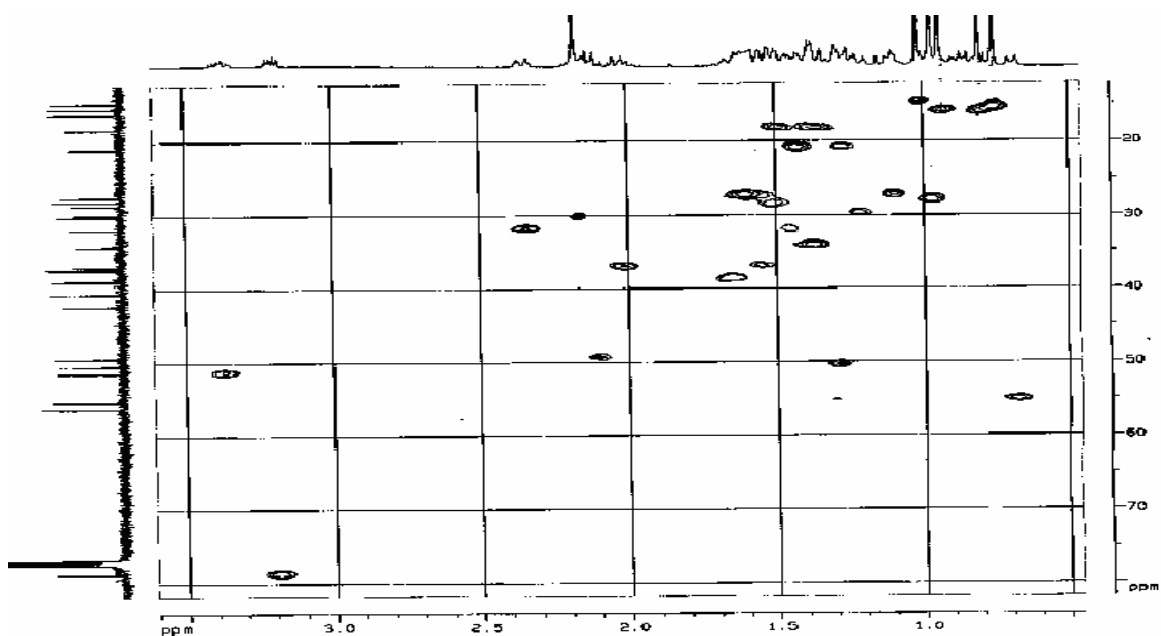


FIGURA 66: MAPA DE CONTORNO HMQC DA SUBSTÂNCIA EP-2 – ácido diidrobetulínic -  $\text{CDCl}_3$ , gts. pyd.; 400MHz

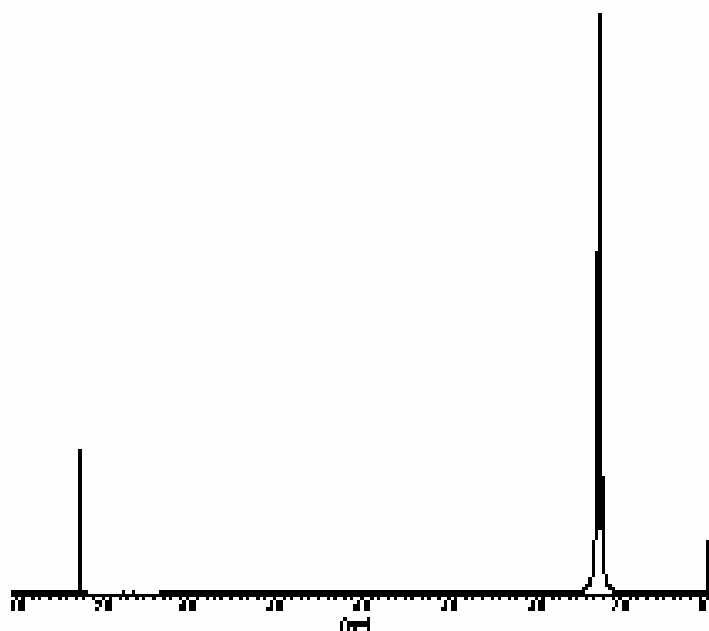


FIGURA 67: ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUSBTÂNCIA EP-3 -  $\text{CDCl}_3$ ; 200MHz

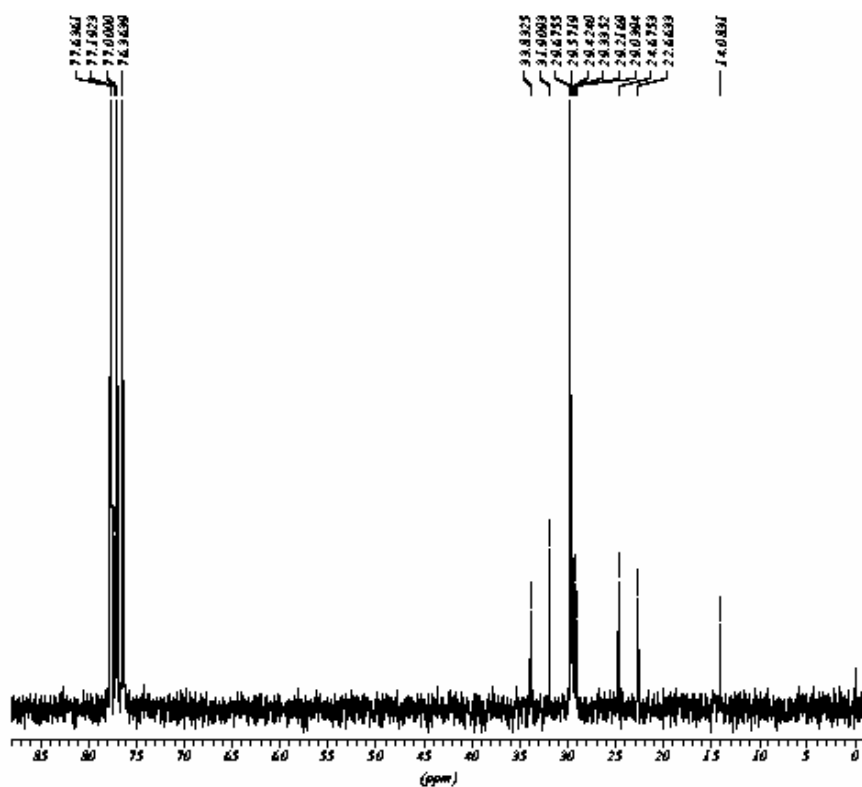


FIGURA 68: ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUSBTÂNCIA EP-3 -  $\text{CDCl}_3$ ; 50MHz

